

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**TATIANE HELENA BATISTA**

**INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOBRE AS**  
**RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E APÓS ESTRESSE IMUNOLÓGICO NA**  
**PROLE**

ALFENAS/MG

2019

**TATIANE HELENA BATISTA**

**INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOBRE AS  
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E APÓS ESTRESSE IMUNOLÓGICO NA  
PROLE**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG.

Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Co-orientadora: Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti

ALFENAS/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Batista, Tatiane Helena.  
B326i      Influência da desnutrição proteica materna sobre as respostas  
comportamentais e após estresse imunológico na prole. / Tatiane Helena  
Batista. - Alfenas/MG, 2019.  
136 f.: il. --  
Orientador: Alexandre Giusti Paiva.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade  
Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. Deficiência de Proteína. 2. Comportamento Materno. 3. Transtorno  
Autístico. 4. Comportamento Animal. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD-616.39


**TATIANE HELENA BATISTA**

**INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOBRE AS  
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E APÓS ESTRESSE IMUNOLÓGICO NA  
PROLE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.  
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em: 25 / 02 / 2019

Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dra. Maristela de Oliveira Poletini  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura: 

Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten  
Instituição: Universidade Paulista

Assinatura: 

Prof. Dr. Renato Leonardo de Freitas  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãs, sobrinhos  
e ao meu esposo, com todo o meu amor!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve ao meu lado segurando as minhas mãos! Pude sentir a Tua bondade e misericórdia a cada manhã, e isso renovou e renova minhas forças para sempre seguir em frente! Te amo Deus!

À minha mãe Nair e ao meu pai João, por acreditarem em mim e por não medirem esforços para realizarem os meus sonhos! Vocês são o maior exemplo de amor e honestidade! Agradeço pela dedicação e amor incondicional!

Às minhas irmãs: Beatriz, Jackeline e Josiane, por acreditarem em mim mais que eu mesma, pelos conselhos, amizade e por todo amor! Cada uma, com seu jeito único, me inspiram a ser a cada dia melhor! Aos meus sobrinhos lindos Gabriel e Caio, que me alegram só com o sorriso, obrigada por fazerem meus dias mais felizes e leves...amo vocês. À minha linda sobrinha Gabrielly, pelo incentivo e por me inspirar a batalhar pelos meus sonhos! Sua garra e determinação são uma fonte de inspiração para mim. Te amo! Aos meus cunhados Josué e Eduardo, pelo incentivo, apoio e orações.

Ao meu esposo Cristiano, sou eternamente grata por todo apoio, paciência e amor que foram fundamentais para a realização deste sonho! Te amo.

À prof. Dr. Fabiana Cardoso Vilela, que através do seu amor e dedicação incansável à pesquisa me inspirou e me deu a oportunidade de conhecer o mundo científico. Sua força, coragem e perseverança me inspiram a cada dia. Muito obrigada pela paciência, ensinamentos e pela amizade. Serei eternamente grata!

Ao prof. Alexandre Giusti Paiva, pelos ensinamentos transmitidos, por toda ajuda e por possibilitar que este trabalho fosse realizado em um excelente laboratório. Muito obrigada!

A todos os amigos que passaram pelo laboratório e foram os primeiros em quem me espelhei pela grande perseverança e dedicação! Minha eterna gratidão!

Agradeço também aos amigos que a caminhada científica me proporcionou, em especial agradeço a todos os amigos do laboratório de Fisiologia Translacional. Obrigada pelas ajudas nos experimentos, pelas trocas de conhecimento, pelos momentos de descontração que tornaram a caminhada mais leve e pelas palavras de incentivo e apoio. Contem sempre comigo! E nunca se esqueçam de me convidarem para os saborosos e descontraídos lanches da tarde!

À prof. Dr. Bruna Kalil, pela disponibilidade e gentileza de ter realizado a dosagem de corticosterona na USP e pelos conhecimentos transmitidos em nossas reuniões. Muito obrigada!

Ao técnico José dos Reis, agradeço por toda ajuda e pelos momentos de descontração. Sempre com tanta presteza e dedicação tornou possível a realização de cada experimento! Agradeço de coração por tudo!

Às funcionárias Giselda e Luana que sempre zelaram com tanto carinho por tudo! Agradeço também pela amizade e momentos de descontração!

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Unifal, Adriana, sempre tão prestativa e atenciosa!

Aos roedores utilizados nos experimentos que foram primordiais para a realização desta tese.

À UNIFAL-MG, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio estrutural e financeiro.

*Senhor, Tu me sondaste e me conheces,  
Tu conheces o meu assentar e o meu levantar; de longe entendes o meu pensamento.  
Cercas o meu andar e o meu deitar; e conheces todos os meus caminhos.  
Sem que haja uma palavra na minha língua, eis que, ó Senhor, tudo conheces.  
Tu me cercaste em volta e puseste sobre mim a tua mão.  
Tal ciência é para mim maravilhosíssima; tão alta, que não posso atingir.*

*(Trecho de Salmos 139)*



## RESUMO

O comportamento materno (CM) é fundamental para a sobrevivência da prole e alterações nesse tipo de comportamento podem ocasionar mudanças comportamentais na prole. Neste estudo, avaliamos se a restrição proteica materna poderia influenciar nas respostas comportamentais dos filhotes. Nossos resultados demonstraram que mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas apresentam um aumento do CM, entretanto esse aumento do CM não alterou as respostas comportamentais dos filhotes. Sabe-se que desnutrição proteica materna pode ser um fator contribuinte para as desordens psiquiátricas presente nos descendentes. Entre as desordens psiquiátricas, a Desordem do Espectro Autista (DEA) é um dos maiores desafios a ser enfrentado em todo o mundo. Por esta razão nós testamos a correlação entre restrição proteica materna com sintomas semelhantes ao autismo nos filhotes machos e fêmeas adolescentes utilizando-se para isto testes comportamentais em roedores que se assemelham as principais características comportamentais observadas em humanos com DEA. Durante a lactação, no dia pós-natal 5 (DPN 5) foi realizada a quantificação das vocalizações ultrassônicas (VUS) bem como a análise do *homing behavior* no DPN 13. Durante a adolescência, no DPN 30-32 os filhotes foram avaliados nos testes de campo aberto, teste da placa com buracos, avaliação do comportamento juvenil de brincadeira e no teste de reconhecimento de objetos. Os resultados demonstraram que os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica vocalizam menos e além disso demonstram prejuízos na discriminação social no teste de *homing behavior*. Na adolescência, a prole de mães hipoproteicas de ambos os sexos não apresentam alterações na atividade locomotora no teste de campo aberto, entretanto exibem um comportamento estereotipado no teste da placa com buracos, diminuição do comportamento de brincadeira e a prole de filhotes machos apresentam um maior interesse em explorar o objeto familiar. Esses resultados mostram que a restrição proteica materna causa na prole comportamentos que se assemelham as principais características comportamentais associadas ao DEA. Além disso é conhecido que a desnutrição materna pode prejudicar o desenvolvimento do sistema imunológico, assim conhecendo-se que o comportamento doentio depende da comunicação neuro-imune, o outro objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos da restrição proteica materna sobre o comportamento doentio, febre, resposta neuroendócrina e neuroinflamação na prole de machos adultos após a administração de 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (i.p.) de lipopolissacarídeo (LPS). O comportamento doentio foi avaliado por meio dos testes de campo, interação social e nado forçado, a resposta neuroendócrina por meio a avaliação dos níveis de corticosternona e a neuroinflamação por meio da análise do nível de expressão de Proteína Glial Fibrilar Ácida por *Western blotting*. Nossos resultados avaliados em 2 e 6 horas após a administração do LPS demonstraram que o LPS induz um comportamento doentio prolongado nos filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica, febre, aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e corticosterona plasmática, sem alterações na expressão de GFAP. Tais resultados evidenciam que a restrição proteica materna induz na prole adolescente comportamentos que se assemelham as principais características associadas ao DEA e induz um comportamento doentio prolongado nos filhotes machos adultos.

Palavras-chave: Deficiência de Proteína. Comportamento Materno. Transtorno Autístico. Comportamento Animal.

## ABSTRACT

The maternal behavior (MB) is fundamental to offspring survival and this type of behavior alterations can cause behavioral changes on adult offspring. In this study we evaluated if maternal protein restriction might influence in behavioral responses of adult puppies. Our results demonstrated that mothers fed with the restricted diet presented MB increase; however, this increase did not change behavioral responses of adult puppies. It is known that maternal proteic malnutrition might be a contributory factor for psychiatric disorders on descendants. Between psychiatric disorders, autism spectrum disorder (ASD) is one of the biggest challenges to be faced in the whole world. Due to this fact, we tested the correlation between maternal proteic restriction with similar symptoms to the autism on male puppies and female adolescents using for this behavioral assays in rodents, which resemble to the main behavioral characteristics observed in humans with ASD. During lactation, in post-natal day 5 (PND 5) ultrasonic vocalizations quantification (USV) was accomplished as well as homing behavior analysis at PND 13. During adolescence, at PND 30-32 puppies were evaluated in open field tests, hole board, play social behavior and object recognizing test. Results demonstrated that puppies from mothers fed with hypoproteic diet vocalized less and besides this demonstrated impairment on social discrimination in homing behavior test. In adolescence, offspring of hypoproteic mothers of both sexes did not present locomotor activity in the open field test (OF); however, they exhibited a stereotyped behavior in whole board test, decrease of joking behavior and male puppies' offspring presented a higher concern to explore the familiar object. These results show that maternal proteic restriction causes behaviors in offspring that resemble to the main behavioral characteristics associated with ASD. It is still known that maternal malnutrition might affect immunologic system development, thus knowing that the sickness behavior depends on the neuroimmune crosstalk, another study objective of ours was to evaluate maternal proteic restriction effects on sickness behavior, fever, neuroendocrine response and neuroinflammation of adult male offspring after 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (i.p.) administration of lipopolysaccharide (LPS). The sick behavior in this study was evaluated by open field tests, social interaction and forced swim, the neuroendocrine response through the evaluation of corticosterone levels and neuroinflammation by analyzing the level of expression of Fibrillary Acid Glial Protein by Western blotting. Our results assessed at 2 and 6 hours after LPS administration demonstrated that LPS induces prolonged sickness behavior in adult male offspring from mothers fed the hypoprotein diet, fever, increased TNF- $\alpha$  levels, and plasma corticosterone levels without changes in the expression of GFAP. These results show that maternal protein restriction induces adolescent offspring behaviors that resemble the main features associated with ASD and induce prolonged sickness behavior in adult male offspring.

Key-words: Protein Deficiency. Maternal Behavior. Autistic Disorder. Behavior, Animal.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação esquemática de alguns parâmetros maternos exibidos pelas ratas lactantes.....	22
Figura 02	LPS da parede celular da membrana externa de bactérias gram-negativas.....	28
Figura 03	Resposta imune inata desencadeada pelo LPS.....	29
Figura 04	Vias da comunicação sistema imune-cérebro.....	30
Figura 05	Alimentação das ratas gestantes e lactantes.....	37
Figura 06	Avaliação das ratas alimentadas com a dieta normoproteica ou hipoproteica.....	39
Figura 07	Visualização do comportamento materno em caixas transparentes.....	40
Figura 08	Campo aberto.....	41
Figura 09	Labirinto em Cruz Elevado.....	42
Figura 10	Avaliação dos filhotes na lactação, adolescência e idade adulta.....	43
Figura 11	<i>Homing behavior</i> .....	47
Figura 12	Placa com buracos .....	48
Figura 13	Comportamento juvenil de brincadeira.....	13
Figura 14	Reconhecimento de objetos.....	50
Figura 15	Efeitos da restrição proteica materna sobre o ganho de peso das ratas durante a gestação e lactação.....	58
Figura 16	Efeitos da restrição proteica materna sobre a ingestão de ração e de água durante a gestação e lactação.....	60
Figura 17	Efeitos da restrição proteica materna sobre a porcentagem do comportamento materno e não materno.....	61
Figura 18	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental de ratas lactantes no teste de campo aberto.....	62
Figura 19	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental de ratas lactantes no teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	63

Figura 20	Efeitos da restrição proteica materna sob o ganho de peso da ninhada durante a lactação.....	64
Figura 21	Efeitos da restrição proteica materna sob o número de vocalizações dos filhotes machos e fêmeas.....	65
Figura 22	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de <i>homing behavior</i> .....	66
Figura 23	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste da placa com buracos.....	67
Figura 24	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de brincadeira social.....	68
Figura 25	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de reconhecimento de objetos.....	69
Figura 26	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de campo aberto.....	70
Figura 27	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de campo aberto 2 horas após a injeção com salina ou LPS.....	72
Figura 28	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de Interação Social 2 horas após a injeção com salina ou LPS.....	73
Figura 29	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance no teste de nado forçado dos filhotes machos adultos 2 horas após a injeção com salina ou LPS.....	74
Figura 30	Efeito do pré-tratamento com a dieta hipoproteica e dieta normoproteica e tratamento com salina ou LPS sob a temperatura corpórea dos ratos machos adultos.....	76
Figura 31	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de campo aberto 6 horas após a injeção com salina ou LPS.....	78
Figura 32	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de Interação Social 6 h horas após a injeção com salina ou LPS .....	79

Figura 33	Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance no teste de nado forçado dos filhotes machos adultos 6 horas após a injeção com salina ou LPS.....	81
Figura 34	Efeitos da restrição proteica materna sobre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ (pg/ml) nos filhotes machos adultos 2 e 6 horas após a injeção com salina ou LPS.....	82
Figura 35	Efeitos da restrição proteica materna sobre os níveis de corticosterona (ng/ml) nos filhotes machos adultos 2 e 6 horas após a injeção com salina ou LPS.....	84
Figura 36	Efeitos da restrição proteica materna sobre a expressão de GFAP no hipotálamo dos filhotes machos adultos 2 e 6 horas após a injeção com salina ou LPS.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Composição nutricional da dieta normoproteica AIN 93 G.....	38
Tabela 02	Composição nutricional da dieta hipoproteica 93 G modificada 6% proteína.....	38
Tabela 03	Análise de variância de duas vias do ganho de peso referentes aos períodos de gestação e lactação.....	58
Tabela 04	Análise de variância de duas vias da ingestão diária de ração e água períodos de gestação e lactação.....	60
Tabela 05	Análise de variância de duas vias do ganho de peso da ninhada durante a lactação.....	64
Tabela 06	Análise de variância de duas vias da performance comportamental dos ratos machos adultos no teste de campo aberto 2 horas após o tratamento com LPS ou salina.....	72
Tabela 07	Análise de variância de duas vias do tempo (s) de interação social dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com LPS ou salina.....	73
Tabela 08	Análise de variância de duas vias do nado forçado dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS.....	75
Tabela 09	Análise de variância de duas vias do índice térmico na avaliação da temperatura corporal por telemetria dos filhotes machos adultos após o tratamento com salina ou LPS.....	76
Tabela 10	Análise de variância de duas vias da performance comportamental dos ratos machos adultos no teste de campo aberto 6 horas após o tratamento com LPS ou salina.....	79
Tabela 11	Análise de variância de duas vias do tempo de interação dos filhotes machos adultos 6 horas após o tratamento com LPS ou salina.....	80
Tabela 12	Análise de variância de duas vias do nado forçado dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com LPS ou salina.....	81
Tabela 13	Análise de variância de duas vias dos níveis de TNF- $\alpha$ dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS.....	83
Tabela 14	Análise de variância de duas vias dos níveis de TNF- $\alpha$ dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.....	83

Tabela 15	Análise de variância de duas vias dos níveis de corticosterona dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS...	84
Tabela 16	Análise de variância de duas vias dos níveis de corticosterona dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS...	85
Tabela 17	Análise de variância de duas vias da expressão de GFAP no hipotálamo dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS.....	86
Tabela 18	Análise de variância de duas vias da expressão de GFAP no hipotálamo dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.....	86

## LISTA DE ABREVIACÕES

ACTH -	Hormônio estimulador do córtex da adrenal
CM -	Comportamento materno
COX -	Ciclooxigenase
CEUA -	Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas
DPN -	Dia pós-natal
DN -	Dieta normoproteica
DH -	Dieta hipoproteica
DG -	Dia de gestação
DL -	Dia de lactação
FAO -	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FIDA -	Fundo Internacional de Desenvolvimento Agrícola
HHA -	Hipotálamo-hipófise-adrenal
GFAP -	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
i.p. -	Intraperitoneal
IL -	Interleucina
LPS -	Lipopolissacarídeo
LBP -	Proteína de ligação ao LPS ( <i>LPS- binding protein</i> )
Min. -	Minutos
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PMA -	Programa Mundial de Alimentos
PVN -	Núcleo paraventricular do hipotálamo
POA -	Área pré-óptica
PG -	Prostaglandinas
RI -	Índice de reconhecimento
SNC -	Sistema nervoso central
TN -	Tempo de exploração do novo objeto
TF -	Tempo de exploração do objeto familiar
DEA -	Desordem do Espectro Autista
UNICEF -	Fundo das Nações Unidas para a Infância



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	NUTRIÇÃO MATERNA E CONSEQUÊNCIAS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA.....	19
1.2	COMPORTAMENTO MATERNO E MODIFICAÇÕES NA RELAÇÃO MÃE-FILHOTE.....	21
1.3	DESORDEM DO ESPECTRO AUTISTA.....	24
1.4	COMPORTAMENTO DOENTIO.....	26
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	ANIMAIS.....	36
4.2	ACASALAMENTO.....	36
4.3	ALIMENTAÇÃO MATERNA E GRUPOS EXPERIMENTAIS DAS RATAS PRENHES.....	36
4.4	AVALIAÇÃO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES.....	38
4.5	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E INGESTÃO DE ÁGUA E RAÇÃO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES.....	39
4.6	PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES..	39
4.6.1	Comportamento materno.....	39
4.6.2	Campo aberto.....	41
4.6.3	Labirinto em Cruz Elevado.....	42
4.7	PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS E DIRECIONAMENTO DOS FILHOTES AOS TESTES COMPORTAMENTAIS DA LACTAÇÃO, ADOLESCÊNCIA E VIDA ADULTA.....	42
4.8	GRUPOS EXPERIMENTAIS DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS NA LACTAÇÃO E ADOLESCÊNCIA E DOS FILHOTES MACHOS ADULTOS.....	43
4.8.1	Lactação e adolescência.....	43
4.8.2	Filhotes machos adultos.....	44

4.9	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	45
4.10	AVALIAÇÃO DA VOCALIZAÇÃO E DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A LACTAÇÃO.....	45
4.10.1	Vocalizações ultrassônicas (VUS).....	46
4.10.2	Homing Behavior.....	46
4.11	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A ADOLESCÊNCIA....	47
4.11.1	Teste de campo aberto.....	47
4.11.2	Teste da placa com buracos.....	48
4.11.3	Teste do comportamento juvenil de brincadeira.....	48
4.11.4	Teste de reconhecimento de objetos.....	49
4.12	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO NOS FILHOTES MACHOS ADULTOS.....	50
4.12.1	Campo aberto.....	51
4.12.2	Interação social.....	52
4.12.3	Nado forçado.....	52
4.12.4	Monitoramento da temperatura corporal por telemetria dos filhotes machos adultos.....	53
4.12.5	Dosagem de TNF- $\alpha$ .....	53
4.12.6	Dosagem de corticosterona.....	54
4.12.7	Avaliação da expressão proteica de GFAP por <i>Western Blotting</i> .....	54
4.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
5.1	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O GANHO DE PESO, INGESTÃO DE RAÇÃO E ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES.....	57
5.1.1	Ganho de peso.....	57
5.1.2	Ingestão de ração e água.....	58
5.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB A PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DE RATAS LACTANTES.....	60
5.2.1	Avaliação da porcentagem do comportamento materno e não materno	

na primeira semana de lactação.....	61
5.2.2 Campo aberto.....	62
5.2.3 Labirinto em cruz elevado.....	62
5.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O GANHO DE PESO DA NINHADA DURANTE A LACTAÇÃO, VOCALIZAÇÃO E PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A LACTAÇÃO.....	63
5.3.1 Ganho de peso da ninhada durante a lactação.....	64
5.3.2 Vocalizações ultrassônicas.....	64
5.3.3 Homing behavior.....	65
5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB A PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A ADOLESCÊNCIA.....	66
5.4.1 Teste da placa com buracos.....	66
5.4.2 Comportamento juvenil de brincadeira.....	67
5.4.3 Reconhecimento de objetos.....	68
5.4.4 Campo aberto.....	69
5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O COMPORTAMENTO DOENTIO NOS FILHOTES MACHOS ADULTOS.....	71
5.5.1 Campo aberto.....	71
5.5.2 Interação social.....	73
5.5.3 Nado forçado.....	73
5.5.4 Telemetria.....	75
5.5.5 Campo aberto.....	76
5.5.6 Interação social.....	79
5.5.7 Nado forçado.....	80
5.6 DOSAGEM DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF- $\alpha$ .....	81
5.7 DOSAGEM DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA.....	83
5.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE <i>GFAP</i> POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	85
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	87
6.1 EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA NO GANHO DE PESO, INGESTÃO DE RAÇÃO E ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E	

	LACTANTES E PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES.....	87
6.2	EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O GANHO DE PESO DA NINHADA DURANTE A LACTAÇÃO, VOCALIZAÇÃO E PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A LACTAÇÃO.....	91
6.3	EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB A PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A ADOLESCÊNCIA.....	93
6.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA NA TEMPERATURA CORPORAL E COMPORTAMENTO DOENTIO INDUZIDOS POR LPS NOS FILHOTES MACHOS ADULTOS.....	95
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	108
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	109
	<b>ANEXOS</b> .....	126

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 NUTRIÇÃO MATERNA E CONSEQUÊNCIAS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA

Durante o período gestacional é fundamental que a gestante consuma uma dieta saudável que inclua a ingestão adequada de carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais para atender tanto as necessidades maternas quanto as fetais (OMS, 2017). Além disso a ingestão balanceada de energia e nutrientes durante a gestação deve ser capaz de satisfazer as necessidades da mãe bem como as do feto em desenvolvimento e ainda permitir que a mãe estabeleça as reservas de nutrientes necessárias para o período de lactação (WILLIAMSON, 2006).

Sob o ponto de vista nutricional a gravidez é dividida em duas grandes fases, a primeira fase é a chamada fase materna ou fase anabólica que compreende a primeira metade da gestação, onde a gestante aumenta seu consumo de nutrientes e o organismo materno se prepara para suprir as demandas do feto. Já a segunda fase é a chamada fase fetal ou fase catabólica que ocorre durante a segunda metade da gestação e é o período em que grande parte das reservas nutricionais da mãe são utilizadas pelo feto (ROSSO; CRAMOY, 1979).

Entretanto, o consumo de nutrientes suficientemente adequado para suprir a demanda fetal pode estar potencialmente prejudicado em diversas condições, entre elas, socioeconômicas. Em países de baixa renda muitas vezes o consumo de vegetais, carnes, produtos derivados do leite e frutas é escasso e insuficiente para atender as necessidades nutricionais básicas da gestante (OMS, 2016).

Infelizmente, a fome no mundo parece estar em ascensão novamente, em um recente relatório intitulado “*O estado da segurança alimentar e nutricional no mundo*” lançado em setembro de 2017 pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), conjuntamente com o Fundo Internacional de Desenvolvimento Agrícola (FIDA), o Programa Mundial de Alimentos (PMA), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de pessoas desnutridas aumentou de 777 milhões em 2015 para 815 milhões em 2016. Segundo o relatório, essa ascensão da instabilidade alimentar seria atribuída a mudanças climáticas que podem afetar o plantio e a distribuição de alimentos em muitos países, bem como pela desaceleração econômica em todo o mundo o que prejudica ainda mais o acesso aos alimentos pelos mais desfavorecidos. Além disso, quase um terço (33%) das mulheres em idade reprodutiva em todo o mundo sofrem de anemia, o que

coloca a nutrição e a saúde de muitas crianças em risco (FAO, FIDA, PMA, UNICEF, OMS, 2017).

A nutrição inadequada durante o período fetal e neonatal tanto em humanos quanto em roedores pode programar a descendência ao desenvolvimento tardio de doenças crônicas ao longo da vida, como por exemplo levar ao desenvolvimento de obesidade e diabetes (NESTERENKO et al., 2009). Durante o desenvolvimento intra-uterino deficiências nutricionais na qual o feto é exposto podem alterar permanentemente a estrutura e função do organismo fetal e levar ao desenvolvimento de diversas doenças durante a idade adulta, este é um fenômeno denominado “Programação Fetal”. A programação fetal é descrita como um processo estimulado no útero, o qual estabelece uma adaptação permanente no feto, conduzindo ao desenvolvimento de diversas alterações durante a idade adulta (LUCAS, 1991; LUCAS, 1998). Ainda neste sentido, outra teoria para explicar o surgimento de doenças durante a idade adulta em detrimento de déficits nutricionais durante o desenvolvimento intra-uterino é a “Teoria de Barker” ou Teoria da Origem Fetal das Doenças do Adulto, que considera que as deficiências nutricionais durante o período gestacional originam uma adaptação metabólica e/ou estrutural permanente no feto que aumenta o risco de doença coronária, hipertensão arterial; diabetes tipo 2 e resistência à insulina (BARKER, 1995; LAW et al., 2002; BARKER, 1999).

A associação entre nutrição materna com o desenvolvimento de doenças durante a idade adulta pode ser exemplificada em diversos estudos. Entre eles, um estudo que avaliou as consequências da desnutrição durante a gestação em seres humanos durante a chamada “fome holandesa” que ocorreu durante a segunda Guerra Mundial entre os anos 1944 e 1945. Neste período, a entrada de alimentos foi bloqueada no oeste Holandês, além disso o rigoroso inverno impediu a produção de alimentos. Nesta fase de extrema privação alimentar, mulheres grávidas e lactantes tinham direito a uma quantidade extra de alimentos, porém com a extrema privação alimentar estes suprimentos extras não foram mais fornecidos. Mesmo neste cenário de fome e desnutrição, muitas mulheres deram à luz a seus filhos, porém, os efeitos da desnutrição materna sobre o desenvolvimento dos filhos cujas mães tinham passado pela fome holandesa foi potencialmente prejudicado. A exposição à fome em diferentes períodos da gestação levou ao nascimento de bebês com baixo peso ao nascer, os quais eram propensos a obesidade, apresentavam intolerância à glicose e pressão arterial elevada durante a idade adulta (ROSEBOOM et al., 2001; PAINTER ; ROSEBOOM; BLEKER, 2005). Além da susceptibilidade aumentada ao desenvolvimento de doenças crônicas durante a idade adulta, outro estudo relata que os filhos das mulheres grávidas durante a fome holandesa ainda

apresentavam um risco aumentado de desenvolver esquizofrenia quando adultos (BROWN; SUSSER, 2008).

Estes dados corroboram com a Teoria da Programação Fetal e a Teoria de Barker e reforçam a idéia de que a desnutrição materna pode predispor os descendentes a doenças tardias durante a idade adulta.

Na literatura vários modelos animais são utilizados para induzir a desnutrição, entre eles pode-se citar o modelo de redução da quantidade alimentar, redução da ingestão calórica, aumento do tamanho da ninhada e redução do teor proteico da dieta (YOUNG; LEE; LEBENTHAL, 1987; PATHAK, et al., 1981; DURAN FERNANDEZ-FEIJOO, et al., 2017; HERNANDEZ et al., 2005; BELLUSCIO et al., 2014; BATISTA et al., 2016).

Entre os modelos citados, a restrição proteica materna tem recebido grande atenção por parte da comunidade científica, pois predispõe a prole ao desenvolvimento de várias doenças ao longo da vida, como por exemplo, atrasos no início da puberdade da prole fêmea, diminuição do número de néfrons dos filhotes adolescentes, redução a longo prazo do conteúdo lipídico hepático da prole masculina, alteração do desenvolvimento do pâncreas endócrino e também pode favorecer a ocorrência de diabetes tipo 2 nos descendentes adultos (FARIA et al., 2009; CECILIA et al., 2002; QASEM; CHERALA; D'MELLO, 2010; DUMORTIER et al., 2014).

Além das alterações acima citadas, a restrição proteica materna durante o desenvolvimento intra-uterino pode levar a alterações morfológicas e neuroquímicas no sistema nervoso central (SNC) da prole resultando em prejuízos comportamentais mediados por circuitos cerebrais. A maturação cerebral pode ser afetada pela falta de micronutrientes tais como vitaminas ou minerais, porém a carência de proteínas é o fator mais crítico para o desenvolvimento de todas as funções neurobiológicas (MORGANE et al., 1993; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

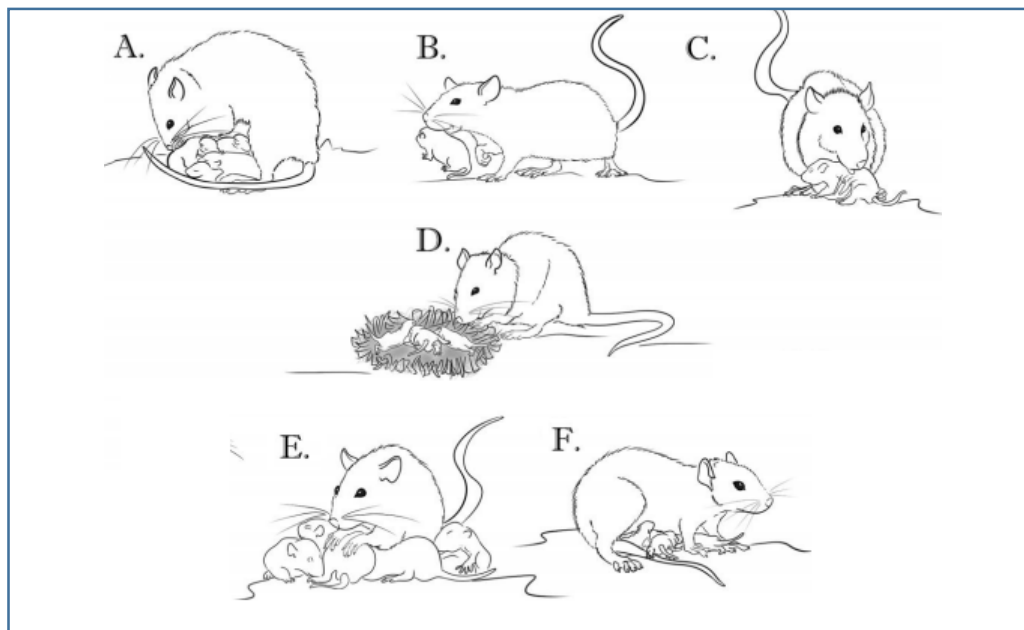
## 1.2 COMPORTAMENTO MATERNO E MODIFICAÇÕES NA RELAÇÃO MÃE-FILHOTE

Além de afetar o desenvolvimento cerebral e alterar aspectos comportamentais da prole, a restrição proteica materna também altera características comportamentais da mãe, como por exemplo o comportamento materno (CM). O CM se caracteriza por um conjunto de

cuidados que a mãe proporciona aos filhotes, estes cuidados se expressam desde a preparação da mãe para o nascimento da prole e se mantêm durante todo o período de lactação. Durante as duas primeiras semanas após o parto este comportamento é mais acentuado, uma vez que os filhotes são incapazes de regular sua própria temperatura e dependem totalmente dos cuidados maternos para sua nutrição e sobrevivência, (GROTA; ADER, 1969).

O CM que as mães realizam para garantir a sobrevivência dos filhotes incluem: 1) amamentação dos filhotes, onde as ratas lactantes adotam uma postura denominada de cifose, em que a mãe se mantêm sobre os filhotes em uma postura arqueada facilitando a amamentação da prole; 2) recolhimento dos filhotes, onde a mãe carrega seu filhote pela boca movendo-o de um local a outro no ninho, ou para transportá-lo para um novo ninho; 3) lambidas (*licking pups*), que tem por função estimular a defecação e a secreção urinária dos filhotes e 4) construção do ninho, que oferece proteção e manutenção da temperatura corporal do filhote na ausência da mãe. (NUMAM; INSEL, 2003; BRUNTON; RUSSELL, 2008). Na figura 01 abaixo são apresentados alguns dos parâmetros maternos exibidos pelas ratas lactantes.

Figura 01- Representação esquemática de alguns parâmetros maternos exibidos pelas ratas lactantes.



Nota: A) posição de cifose, B) carregando os filhotes, C) lambidas, D) construção do ninho, E) agrupando os filhotes, G) sobre os filhotes.

Fonte: Adaptado de VERONESI, 2016.

Todos esses comportamentos exibidos pelas ratas lactantes fazem parte do repertório comportamental materno, e são necessários para o desenvolvimento e sobrevivência da prole (BRIDGES, 2015). Entretanto, esse comportamento que a mãe dirige aos filhotes pode ser modificado por diversos fatores, entre eles o fator nutricional.



Estudos apontam que a restrição proteica materna é um importante fator nutricional capaz de modificar as relações mãe-filhotes. Em um estudo com ratos *Holtzman*, observou-se que mães alimentadas com uma dieta com baixo teor proteico (12% de caseína) apresentaram um aumento do comportamento materno, passando mais tempo na área do ninho quando comparadas às mães alimentadas com a dieta controle (25% de caseína) (MASSARO; LEVITSKY; BARNES, 1974). Além disso, estudos do nosso laboratório demonstraram que ratas *Wistar* alimentadas com a dieta restrita em proteínas (6% de caseína) durante as duas primeiras semanas de gestação apresentaram um aumento do CM com redução do tempo de latência para recuperação dos filhotes, aumento nos tempos gastos em posição de cifose e aumento no tempo de lambida nos filhotes quando comparadas com as ratas alimentadas com a dieta controle (22% de caseína) (BATISTA et al., 2016).

Em contraste, outro estudo demonstrou que camundongos fêmeas da linhagem CF-1 quando alimentadas com uma dieta restrita em proteínas (9% de caseína) durante a gestação e lactação apresentaram diminuição do CM com uma redução no tempo de lambida nos filhotes quando comparadas com camundongos alimentadas com a dieta controle (20% de caseína) (BELLUSCIO et al., 2014). A discrepância entre os estudos no que se refere ao aumento ou diminuição do comportamento materno pode ser explicada pelas diferentes composições da dieta, diferentes linhagens de animais utilizadas, bem como o período de administração da mesma.

Estudos ainda sugerem que o CM pode sofrer variações e levar a alterações no desenvolvimento cognitivo e emocional da prole e ainda influenciar nas respostas comportamentais dos filhotes durante a vida adulta (LIU et al., 1997; KAFFMAN; MEANEY, 2007). Neste sentido, estudos que avaliam as alterações no CM e as influencias nos filhotes demonstram por exemplo que o comportamento de lambida das mães nos filhotes pode modificar circuitos neurais associados à redução do medo, tornando os filhotes hiporresponsivos a ambientes aversivos durante a fase adulta (MENARD et al., 2004). Do mesmo modo, as alterações no CM podem influenciar na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) dos filhotes, onde a prole de mães com alto índice de cuidado materno, durante a idade adulta apresentam hiporresponsividade frente a novos acontecimentos, com baixa ativação do eixo HHA quando comparado com os filhotes de mães pouco cuidadoras (PRYCE; BETTSCHEN; BAHR, 2001; CHAMPAGNE; MEANEY, 2001). Sendo assim, é essencial a avaliação do CM, já que este pode sofrer variações e modificar o desenvolvimento cognitivo, emocional e ainda influenciar no comportamento da prole durante a idade adulta (LIU et al., 1997; KAFFMAN; MEANEY, 2007).

### 1.3 DESORDEM DO ESPECTRO AUTISTA

Como já mencionado anteriormente, a nutrição materna durante o desenvolvimento fetal ou durante o período neonatal resultam na programação do desenvolvimento de múltiplos sistemas dos descendentes, incluindo a maturação e função cerebral (REYES-CASTRO et al., 2017). Além disso, sabe-se que dieta materna com baixo teor proteico durante a gestação e a lactação pode induzir alterações neuroanatômicas irreversíveis na prole, como atrasos na astrogênese, diferenciação neuronal anormal e astrogliose cerebral no córtex e no hipocampo e promover distúrbios na aprendizagem e na memória (GRESSENS et al., 1997; FEOLI et al., 2008; REYES-CASTRO et al., 2017).

Conhecendo-se que a desnutrição proteica materna pode induzir alterações neuroanatômicas na prole como descrito por Gressens et al., (1997), e que, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais-5 (2013), as doenças psiquiátricas são vistas como distúrbios do neurodesenvolvimento, neste estudo propusemos avaliar a correlação entre restrição proteica gestacional e lactacional com o possível surgimento de sintomas semelhantes a Desordem do Espectro Autista (DEA) na prole. A hipótese de correlação entre restrição proteica materna com o surgimento da DEA foi levantada, uma vez que o autismo é também considerado como uma desordem psiquiátrica decorrente de distúrbios do neurodesenvolvimento (MDE-5, 2013).

Entre os distúrbios psiquiátricos menos compreendidos atualmente está a DEA. A DEA é um dos maiores desafios a serem enfrentados em todo o mundo, porque, além de ser considerado um transtorno psiquiátrico com graves consequências comportamentais, não existem tratamentos específicos disponíveis (ZAMBERLETTI; GABAGLIO; PAROLARO, 2017). Além disso, os dados atuais da OMS estimam que em todo o mundo uma a cada 160 crianças tem DEA, sendo este um dado preocupante, já que o DEA persiste não somente na infância, mas também na adolescência e vida adulta, sendo ainda uma condição que afeta mais homens do que mulheres (OMS, 2017; FOMBONNE, 2009).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (2013), a DEA é caracterizado por déficits persistentes na comunicação e na interação social, como por exemplo, déficits na reciprocidade sócio-emocional, nos comportamentos comunicativos não verbais usados para comunicação social, déficits para desenvolver, manter e compreender relacionamentos. Pacientes portadores da DEA apresentam padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, como por exemplo, movimentos motores, uso de

objetos ou fala estereotipada e repetitiva, exemplificados por estereotípias motoras simples como alinhar brinquedos ou girar objetos e repetição de palavras ou frases ditas por outras pessoas. Estes ainda exibem sofrimento extremo em relação a pequenas mudanças, tendo necessidade de rotinas e padrões ritualizados de comportamento, como fazer sempre o mesmo caminho ou ingerir sempre os mesmos alimentos diariamente (MDE-5, 2013).

Diversos modelos animais de indução de autismo vêm sendo utilizado para melhor compreender as causas e consequências dessa desordem. A administração via intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intranasal em roedores em períodos específicos da gestação de lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo no DG 12-17 em camundongos e DG 18-19 em ratos, vírus influenza no DG9, ou ácido poliinosínico-policitidílico no DG 15 (PolyI:C - um análogo sintético de RNA viral) demonstram que a resposta imune materna pode influenciar no desenvolvimento do cérebro fetal, possivelmente através de citocinas circulantes (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012; MEYER; YEE; FELDON, 2007). Esses modelos animais evidenciam que a resposta imune materna pode desregular o desenvolvimento neural dos filhotes e promover anormalidades comportamentais similares ao autismo em humanos (LIBBEY et al., 2005).

Além disso, a administração do ácido valpróico, um medicamento anti-convulsivante, no 12,5 dia de gestação, também resulta em anormalidades semelhantes ao autismo na prole, com redução do volume cerebelar e redução do número de células de purkinje no cerebelo, sendo que a redução no número de células de Purkinje e no volume cerebelar também foram relatadas em indivíduos autistas (INGRAM et al., 2000).

Os estudos acima citados que avaliam modelos animais de autismo são de extrema importância para avaliar as possíveis causas que desencadeiam a DEA em humanos. Além disso, sabe-se que fatores genéticos e fatores ambientais influenciam na susceptibilidade do desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos como a DEA (TORDJMAN et al., 2014). Estudos revelaram que a restrição alimentar intra-uterina na mãe também pode estar envolvida em transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia nos descendentes como descrito por CLAIR et al., (2005), no entanto as informações sobre a correlação entre restrição proteica materna com o surgimento de outra desordem psiquiátrica como a DEA na prole, antes da publicação do presente estudo, não estavam esclarecidas.

Diante do exposto, e sabendo-se que a desnutrição proteica materna pode levar ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na prole e que a prevalência do DEA ainda é alta e até agora não são conhecidas as causas para o seu tratamento, testamos a relação entre a desnutrição proteica materna com o possível surgimento de sintomas semelhantes ao DEA em

filhotes adolescentes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta restrita em proteicas (6%) ou mães alimentadas com a dieta controle (22%). Para isso, utilizamos diferentes testes comportamentais que em conjunto fornecem características que se assemelham a muitas expressões comportamentais fundamentais associadas a DEA (SERVADIO et al., 2016; MELANCIA et al., 2017).

Pacientes com DEA apresentam prejuízos na comunicação e interação social, nas brincadeiras sociais, maiores interesses em objetos já conhecidos (MDE-5, 2013; JORDAN, 2013; DAWSON et al., 2002). Diante disso, testamos a prole nascida de mães alimentadas com dieta hipoproteica (6% de caseína) e a prole nascida de mães alimentadas com dieta normoproteica (22% de caseína) nos seguintes testes comportamentais: 1) teste de vocalizações ultra-sônicas (VUSs), induzidas por isolamento dos filhotes, que fornece medidas quantitativas das VUSs emitidas por filhotes de roedores quando isoladas do ninho, e desempenham um papel comunicativo essencial na interação mãe-filhote (SERVADIO ; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015; WOHR; SCHWARTING, 2013). 2) teste de *homing behavior*, que fornece uma medida inicial de discriminação social, uma vez que permite detectar a capacidade cognitiva, sensorial e motora dos filhotes necessária para discriminar entre o odor neutro e o odor do seu próprio ninho (SERVADIO ; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015; SCATTONI et al., 2008). 3) teste da placa com buracos, que avalia padrões repetitivos que são considerados como parâmetros de comportamento estereotipado (MAKANJUOLA et al., 1977). 4) teste do comportamento juvenil de brincadeira na adolescência, para detectar comportamentos sociais relacionados e não relacionados a brincadeira (SERVADIO ; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015; TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHURENL, 2010). 5) teste de reconhecimento de objetos, que avalia a insistência nas mesmas coisas e a exploração de objetos repetitivos (MELANCIA et al., 2017).

#### 1.4 COMPORTAMENTO DOENTIO

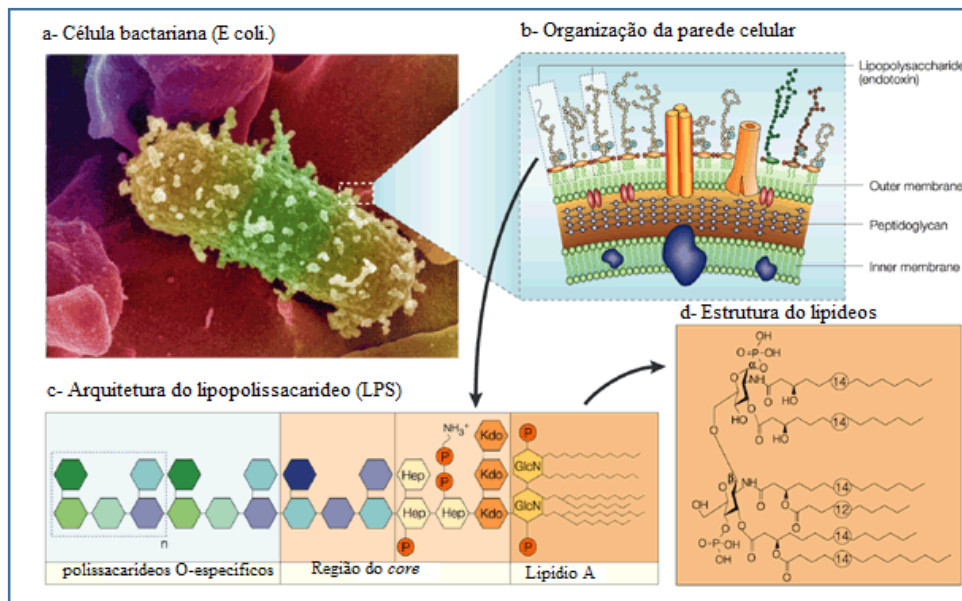
Como será descrito, a expressão comportamental frente ao desafio imunológico com lipopolissacarídeo (LPS) depende da sinalização neuro-imune. Entretanto sabe-se que a desnutrição no período gestacional e ou lactacional pode afetar o desenvolvimento do sistema imunológico. Diante disso, o outro foco do nosso estudo é compreender se a restrição proteica materna pode alterar as repostas comportamentais, neuroendócrinas e neuroinflamatórias dos

filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com dieta hipoproteica (6% de caseína) ou normoproteica (22% de caseína) frente ao desafio imunológico com LPS.

Durante o curso de uma infecção aguda ou diante de desafios imunológicos, o organismo hospedeiro desenvolve uma resposta de defesa generalizada chamada de reação de fase aguda (DANTZER, 2004). Em animais, a resposta de fase aguda à infecção produz sintomas comportamentais como anedonia, redução da ingestão de alimentos, piloereção, anorexia, diminuição da atividade exploratória e redução do comportamento social (AUBERT, 1999). Essas alterações comportamentais observadas na fase aguda da infecção são denominadas de comportamento doentio, ou *sickness behavior* e são consideradas estratégias adaptativas do organismo para combater a infecção (HART, 1988; KENT et al., 1992). Além disso, durante o curso da infecção há o desenvolvimento de febre, que em termos fisiológicos corresponde a um novo estado homeostático caracterizado por uma elevação no *set-point* de regulação da temperatura corporal. A maior temperatura corporal que é alcançada durante a febre estimula a proliferação de células imunes e cria um ambiente desfavorável que diminui a disponibilidade de elementos vitais para o crescimento de muitas bactérias, vírus e patógenos (DANTZER, 2004).

Para o desenvolvimento do *sickness behavior*, modelos animais que simulem a ativação do sistema imune são amplamente empregados. Um dos modelos animais utilizados para simular a ativação do sistema imune consiste na aplicação do LPS que também é conhecido como endotoxina. O LPS é um componente estrutural encontrado na membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas tais como *Escherichia coli*. Ele é um complexo lipídico composto por lipídio A, por um núcleo oligossacarídeo (ou *core*) e antígeno O (polissacarídeos O-específicos) (BEUTLER; RIETSCHER, 2003), como demonstrado na figura 02 abaixo:

Figura 02- LPS da parede celular da membrana externa de bactérias gram-negativas.



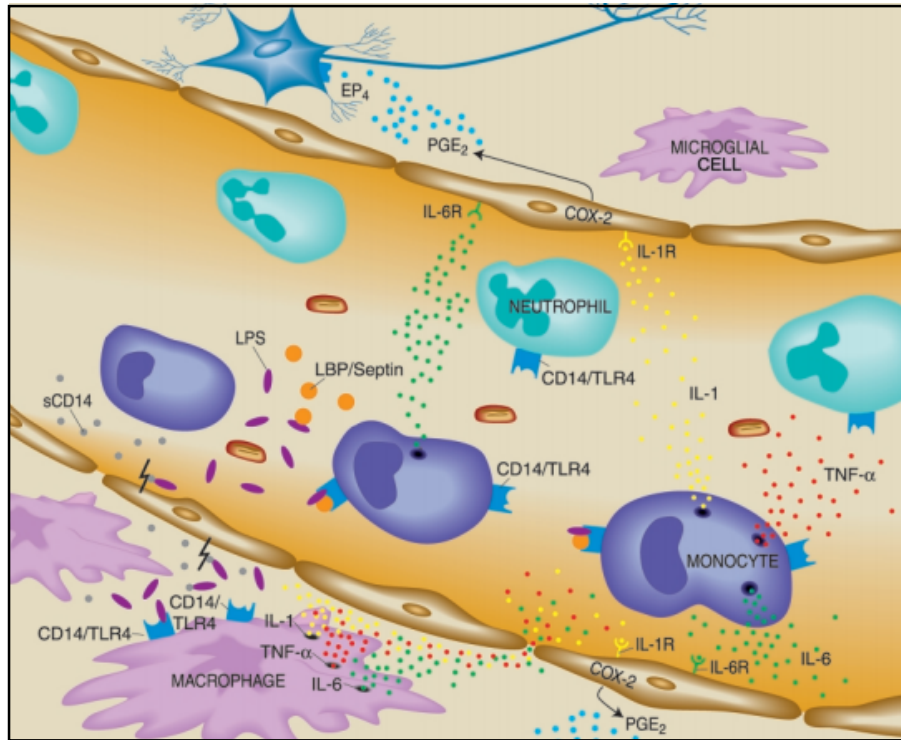
Nota: a) Micrografia eletrônica de *Escherichia coli*, b) representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo (LPS, endotoxina) na parede celular bacteriana, c) arquitetura do LPS, d) estrutura primária do centro tóxico do LPS, o componente lipídico A.

Fonte: Adaptado de BEUTLER; RIETSCHER, 2003.

O lipídio A é um glicofosfolipídio, e é a porção que ancora o LPS na membrana interna, além disso é responsável por desencadear a resposta inflamatória no hospedeiro (RAETZ; WHITFIELD, 2002; KOCH et al., 2012).

Após entrar em contato com o organismo animal, o LPS desencadeia uma série de respostas no organismo infectado, podendo atuar em diferentes tipos celulares como macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais (SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005). Inicialmente, quando o LPS atinge a corrente sanguínea ele se liga a uma proteína chamada de proteína de ligação ao LPS (*LPS-binding protein*) ou LBP. Após a ligação forma-se então um complexo chamado de LBP:LPS, este complexo se liga aos receptores CD14 e TLR-4 (*toll-like receptor*) presentes na superfície da membrana dos macrófagos, desencadeando assim uma cascata de eventos intracelulares que culminam na ativação do fator de transcrição chamado NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é responsável pela ativação de genes que codificam as proteínas pró-inflamatórias chamadas de citocinas, as quais destacam-se a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (HAVA, et al., 2006). A figura 03 abaixo representa a resposta imune inata que é desencadeada pelo LPS.

Figura 03- Resposta imune inata desencadeada pelo LPS.

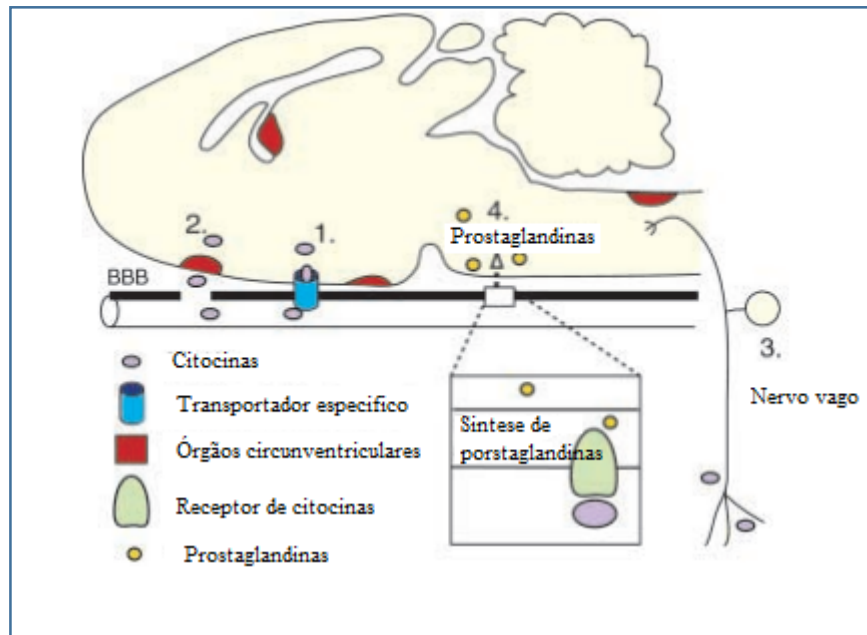


Nota: Secreção de citocinas por monócito/neutrófilos e macrófagos teciduais circulantes pela exposição ao LPS. Ligação do LPS com a LBP. O complexo recém-formado ativa diferentes células por ligação ao seu receptor CD14 e receptor toll-like 4 (TLR4). O complexo LPS/LBP é eficaz em ativar células de origem mielóide (neutrófilos, monócitos, macrófagos e micrógli), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6. Estas citocinas podem se ligar aos seus receptores cognatos expressos na superfície de células que formam a BHE (barreira hematoencefálica), mas não são essenciais para a mediação dos efeitos de LPS no SNC.

Fonte: ZHANG; RIVEST, 2003.

Essas citocinas podem atingir a corrente sanguínea e alcançarem o SNC por diferentes vias e assim fazer a comunicação sistema imune-cérebro: 1) através do transporte direto sobre a barreira hematoencefálica por transportadores específicos, porém essa via não desempenha papel importante durante a fase aguda da inflamação, 2) através dos órgãos circunventriculares, que são regiões cerebrais especializadas desprovidas de barreira hematoencefálica, 3) através da ativação dos nervos sensoriais periféricos, onde as citocinas alcançam as terminações nervosas periféricas vagais ativando receptores dessas terminações e iniciando a transmissão do impulso nervoso pelo nervo vago aferente até a sua ligação no encéfalo (DANTZER et al., 1998), 4) as citocinas ainda podem entrar em contato com os receptores das células endoteliais cerebrais e induzir a síntese de prostaglandinas (PGs) via ativação da enzima cicloxigenase (COX-2), que é responsável pela síntese de prostaglandinas durante condições inflamatórias (ENGBLOM et al., 2002). A figura 04 a seguir representa as vias pelas quais as citocinas alcançam o SNC fazendo a comunicação entre sistema imune e cérebro.

Figura 04- Vias da comunicação sistema imune-cérebro.



Nota: Vias da sinalização através da barreira hematoencefálica. 1) Transporte mediado por carreador, 2) ligação de citocinas nos órgãos circunventriculares. 3) ligação de citocinas no nervo vago e 4) citocinas mediando a produção de prostaglandinas em células associadas com a barreira hematoencefálica.

Fonte: Adaptado de ENGBLOM et al., 2002.

A síntese de prostaglandina, principalmente  $PGE_2$  é dependente da indução de COX-2, e da enzima prostaglandina sintase E. Ambas expressas em células endoteliais de vasos sanguíneos cerebrais e possivelmente macrófagos perivasculares após a administração intravenosa de  $IL-1\beta$  (RIVEST, 2001). A  $PGE_2$  é uma molécula lipofílica que se difunde pelo parênquima cerebral e atua em receptores neuronais chamados de EP3 ou EP4 no tronco encefálico e áreas hipotalâmicas, como o núcleo paraventricular (PVN), que estão envolvidas no controle da atividade do eixo HHA e regulação da temperatura corporal (RIVEST, 2001; OKA et al., 2000).

A ativação do eixo HHA em resposta ao LPS, com liberação do hormônio estimulador do córtex da adrenal ou *adrenocorticotropic hormone* (ACTH) e glicocorticoides constitui-se em uma importante resposta imunoreguladora para suprimir a resposta inflamatória, diminuindo a produção de proteínas da fase aguda e de citocinas pró-inflamatórias (BERCZI, 1998). Com relação a regulação da temperatura corporal, principalmente a  $PGE_2$  é responsável pela ativação de neurônios termossensíveis na área pré-óptica (POA), o que desencadeia o estado febril.

A  $IL-1$  parece ser a principal citocina pró-inflamatória envolvida com o desenvolvimento do comportamento doentio no cérebro, pois a administração de antagonistas do receptor de  $IL-1$  podem atenuar este comportamento induzido por citocinas, entretanto as



vias de sinalização que medeiam os efeitos comportamentais desencadeados por IL-1 ainda não foram esclarecidas (DANTZER, 2001; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Além da produção cerebral dos intermediários moleculares descritos acima que levam ao desenvolvimento da resposta febril bem como ao desenvolvimento do *Sickness behavior*, sabe-se que o desafio imunológico com LPS leva a ativação de células da glia, ativando dentre outros tipos celulares, os astrócitos (BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y.K.; PAHAN, K, 2006). Os astrócitos compreendem a população mais abundante da glia no cérebro de mamíferos e são fundamentais para a boa funcionalidade do SNC uma vez que participam de eventos como migração neuronal, proteção contra o estresse oxidativo, composição da barreira hematoencefálica, transmissões sinápticas e resposta imune com secreção de citocinas pró-inflamatórias (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005). A ativação do sistema imunológico via LPS induz uma resposta coordenada no SNC através da ativação das células gliais que interpretam e propagam sinais inflamatórios no cérebro, influenciando assim em respostas fisiológicas e comportamentais (NORDEN et al., 2016). Uma das consequências comportamentais observadas após a ativação tanto de micróglia quanto de astrócitos é o desenvolvimento do comportamento doentio (DANTZER et al., 2008).

A ativação dos astrócitos promove uma resposta pró-inflamatória, recrutando leucócitos (macrófagos e células dendríticas para o SNC) que são essenciais para a imunidade protetora e eliminação dos patógenos do SNC, entretanto, essas mesmas funções podem ser tóxicas para células do SNC que têm capacidade regenerativa limitada (CARPENTIER; DUNCAN; MILLER, 2007).

Estudos demonstram que os astrócitos estimulados por LPS também são neurotóxicos (BAL-PRICE; BROWN, 2001), e possivelmente essa neurotoxicidade seja mediada pela ação de altos níveis de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CARPENTIER et al., 2005). Essa ativação dos astrócitos, também chamada de astrogliose, desempenha um papel essencial na iniciação e progressão da neuroinflamação (FARINA; ALOISI; MEINL, 2007).

A ativação dos astrócitos está associada à expressão de uma proteína, chamada de Proteína Glial Fibrilar Ácida ou *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). A GFAP constitui o principal biomarcador de astrócitos, e é um tipo de filamento intermediário que compõe o citoesqueleto dos astrócitos que são as células gliais mais abundantes do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos (RODNIGHT et al., 1997).

Assim, diante do exposto e conhecendo que o LPS pode promover alterações comportamentais chamadas de comportamento doentio, bem como promover o desenvolvimento de febre através da comunicação neuro-imune, o outro foco deste estudo,

como já descrito anteriormente, foi analisar se a restrição proteica materna poderia alterar as respostas comportamentais, neuroendócrinas e neuroinflamatórias nos machos adultos frente ao desafio imunológico com LPS.

Uma vez que a desnutrição durante a gestação e durante o desenvolvimento neonatal podem prejudicar a diferenciação do sistema imunológico como descrito por Cunningham-Rundles; MCneeley e Moon (2005), este estudo torna-se de grande relevância para avaliar se tais processos supracitados podem ser modificados pela restrição proteica materna.

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos realizados nos últimos anos demonstraram que a prevalência da DEA está aumentando globalmente, sendo que, em todo o mundo estima-se que uma a cada 160 crianças apresentam esta desordem. A DEA é causada por distúrbios que ocorrem durante o neurodesenvolvimento promovendo anormalidades na estrutura e função cerebral da prole. Uma vez que desnutrição proteica materna também pode promover alterações neuroanatômicas irreversíveis na prole e levar ao desenvolvimento de desordens psiquiátricas, é relevante verificar se um ambiente gestacional restrito em proteínas pode influenciar do desenvolvimento da DEA.

Além disso, sabe-se que a desnutrição materna pode prejudicar o desenvolvimento do sistema imunológico da prole, nesse sentido, conhecendo-se que a expressão do comportamento doentio frente ao desafio imunológico com LPS depende da comunicação neuroimune, ainda é escasso o conhecimento acerca dos prejuízos que o baixo consumo de proteínas gestacional e lactacional pode gerar na prole adulta frente a um processo inflamatório induzido pelo LPS.

Diante disso, a realização deste estudo torna-se de grande relevância, uma vez possibilitará o acréscimo de informações acerca da restrição proteica materna como um dos fatores que podem predispor a prole ao desenvolvimento da DEA. Em adição, a avaliação dos filhotes machos adultos permitirá verificar se estes animais provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica apresentam prejuízos das respostas comportamentais, neuroendócrinas e neuroinflamatórias quando expostos ao LPS.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da desnutrição proteica durante gestação e lactação nas respostas comportamentais da prole de machos e fêmeas adolescentes e após estresse imunológico na prole de machos adultos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para a realização do presente estudo foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar os efeitos da restrição proteica materna sob o ganho de peso, ingestão de ração e água das ratas gestantes e lactantes e sob a performance comportamental das ratas lactantes;
- b) avaliar os efeitos da restrição proteica materna sob o ganho de peso da ninhada durante a lactação, vocalização e performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas durante a lactação;
- c) avaliar os efeitos da restrição proteica materna sob a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas durante a adolescência;
- d) avaliar os efeitos da restrição proteica materna sob o comportamento doentio induzido por LPS nos filhotes machos adultos;
- e) avaliar os efeitos da restrição proteica materna sob a resposta febril induzida por LPS nos filhotes machos adultos;

- f) avaliar os efeitos da restrição proteica materna sob os níveis plasmáticos de TNF-  $\alpha$  nos filhotes machos adultos submetidos ao desafio imunológico com LPS;
- g) avaliar os efeitos da restrição proteica materna sob os níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos adultos submetidos ao desafio imunológico com LPS;
- h) avaliar dos efeitos da restrição proteica materna sob a expressão hipotalâmica da Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) nos filhotes machos adultos submetidos ao desafio imunológico com LPS.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas – MG (CEUA), (Protocolo 635/2015), conforme consta no **ANEXO I**.

### 4.1 ANIMAIS

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL. Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* machos e fêmeas de 7 a 8 semanas de vida para acasalamento. Após a chegada do biotério, os animais passaram por um período de ambientação ao novo ambiente por 7 dias, onde foram mantidos em caixas de polipropileno (40 cm x 33 cm x 16 cm), adequadas à sua manutenção, em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e iluminação (12 h claro/escuro: 07h00min - 19h00min) com livre acesso à água e ração.

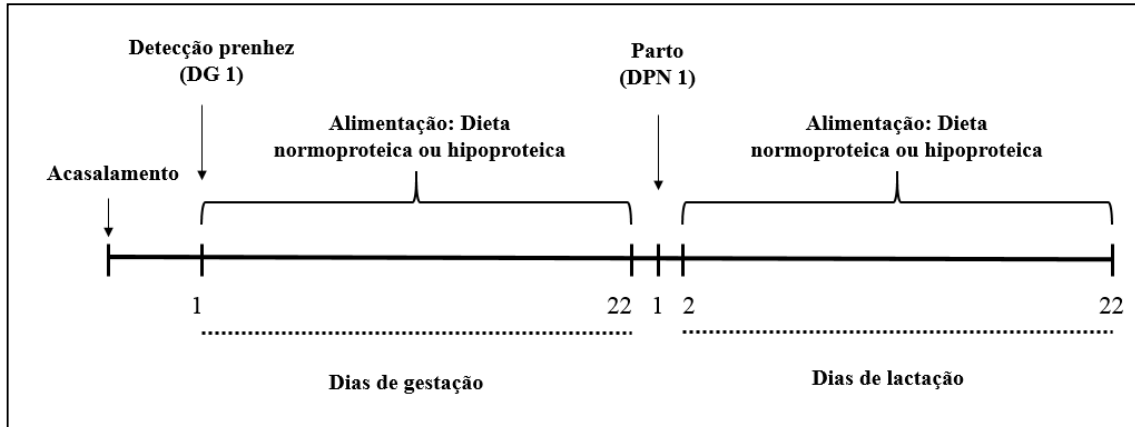
### 4.2 ACASALAMENTO

Após o período de ambientação (7 dias), logo ao final do dia, as ratas foram transferidas para caixas com rato sexualmente experiente na proporção de duas fêmeas para um macho. No dia seguinte, no período da manhã (07h00min - 08h00min) a detecção da prenhez foi realizada após coleta e análise do lavado vaginal em microscópio óptico. A confirmação da presença de espermatozoides no lavado vaginal foi designado como o 1º dia de gestação (1º DG), o dia do parto foi designado como o 1º dia de lactação (1º DL).

### 4.3 ALIMENTAÇÃO MATERNA E GRUPOS EXPERIMENTAIS DAS RATAS PRENHES

Visando facilitar a compreensão do esquema de alimentação materna, a seguir é apresentado o delineamento experimental em linhas temporais.

Figura 05- Alimentação das ratas gestantes e lactantes



Nota: Descrição temporal do tratamento com a dieta normoproteica (22% de caseína) e com dieta hipoproteica (6% de caseína).

Fonte: Da autora.

Após a confirmação da prenhez as ratas foram transferidas para caixas individuais e divididas em dois grupos experimentais como descritos a seguir:

Grupo 1 - Ratas alimentadas com a dieta normoproteica (22% de caseína) do 1º DG ao 22º DL, designadas como **DN**.

Grupo 2 - Ratas alimentadas com a dieta hipoproteica (6% de caseína) do 1º DG ao 22º DL, designadas como **DH**.

Ambos os grupos tiveram livre acesso à água e ração. As ratas pertencentes aos grupos 1 e 2 foram direcionadas as seguintes avaliações:

- avaliação do ganho de peso: n = 12 animais por grupo;
- avaliação da ingestão de ração e de água: n = 11 - 12 animais por grupo;
- avaliação do comportamento materno: n = 8 animais por grupo;
- avaliação da performance comportamental no teste de campo aberto: n = 8 animais por grupo;
- avaliação da performance comportamental no teste de Labirinto em Cruz elevado: n = 8 animais por grupo.

As dietas normoproteica e hipoproteica eram isocalóricas (3.046 Kcal/Kg) e foram obtidas da empresa PRAGSOLUÇÕES *Bioscience*, Jaú-SP, Brazil. A composição nutricional das dietas normoproteica e hipoproteicas estão representadas nas tabelas 01 e 02, respectivamente:

Tabela 01- Composição nutricional da dieta normoproteica AIN 93 G.

	Composição centesimal (%)	Kcal/Kg
Amido de milho	28,300%	698
Caseína	25,900%	800
Amido dextrinizado	16,650%	664
Sacarose	12,100%	484
Óleo de soja	7,00%	360
Celulose microcristalina	5,000%	0
Mix mineral AIN 93G	3,500%	0
Mix vitaminas AIN 93G	1,000%	40
L cistina	0,300%	0,4
Bitartarato de colina	0,250%	0
	100,00%	3046,4

Fonte: Pragsoluções *biociências*

Tabela 02- Composição nutricional da dieta hipoproteica 93 G modificada 6% proteína.

	Composição centesimal (%)	Kcal/Kg
Amido de milho	30,260%	1210,4
Caseína	7,140%	285,6
Amido dextrinizado	16,650%	666
Sacarose	12,100%	484
Óleo de soja	4,000%	360
Celulose microcristalina	25,000%	0
Mix mineral AIN 93G	3,500%	0
Mix vitaminas AIN 93G	1,000%	40
L cistina	0,100%	0,4
Bitartarato de colina	0,250%	0
	100,00%	3046,4

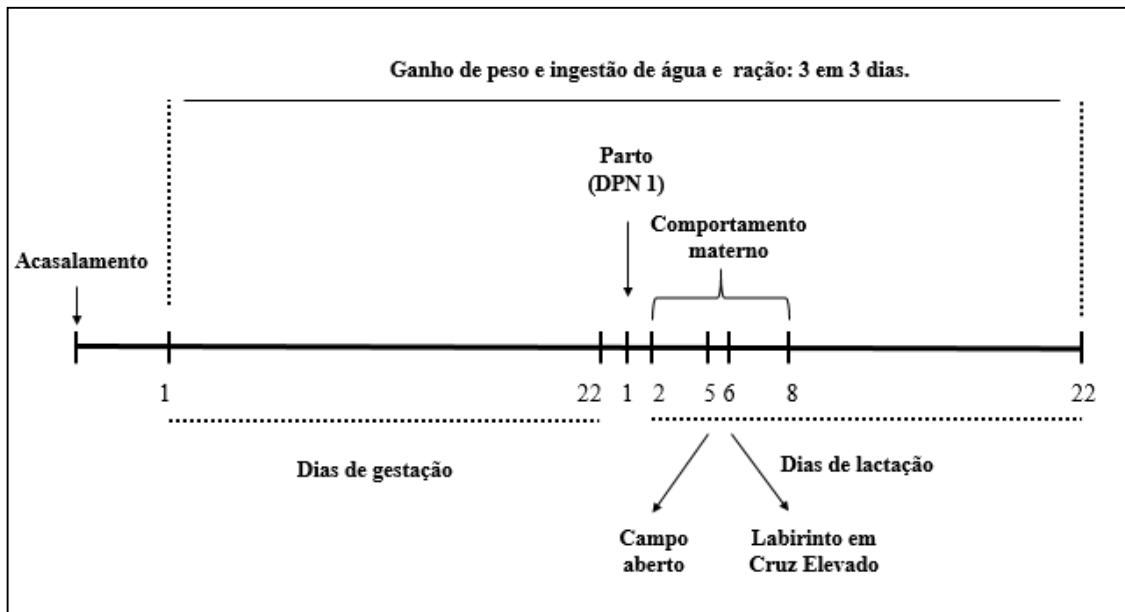
Fonte: Pragsoluções *biociências*.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

Visando facilitar a compreensão da ordem da realização dos experimentos com as mães alimentadas com a dieta hipoproteica ou normoproteica, a seguir é apresentado o delineamento experimental em linhas temporais.



Figura 06- Avaliação das ratas alimentadas com a dieta normoproteica ou hipoproteica.



Nota: Descrição temporal da realização dos experimentos as ratas alimentadas com a dieta normoproteica ou hipoproteica.

Fonte: Da autora

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E INGESTÃO DE ÁGUA E RAÇÃO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

Durante todo o período de gestação e lactação os pesos das ratas gestantes e lactantes foram monitorados a cada três dias, desde o 1º DG até o 22º DL. Além disso, a ingestão de ração e de água foi avaliada diariamente, desde o 1º DG até o 22º DL. Tanto a avaliação de peso quanto a avaliação da ingestão de ração e de água ocorreram sempre no período da manhã, (10h00min.– 11h00min.).

#### 4.6 PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES

##### 4.6.1 Comportamento materno

No 2º DL, o CM de cada rata lactante tanto do grupo normoproteico quanto do hipoproteico foi registrado diariamente do 2º até o 8º dia de lactação, período este em que há uma maior expressão do CM. A análise foi realizada durante dois períodos: 2 sessões diárias

de 90 minutos de observação cada, as quais ocorreram em horários regulares durante a fase clara (9h30min – 11h00min e 15h30min – 17h00min), (adaptado de CHAMPAGNE et al., 2003). A avaliação do CM foi realizada em caixas transparentes individuais (48 cm x 31 cm x 16 cm), como representado pela figura 07, para facilitar a visualização do seu interior, sendo que as ratas foram transferidas para as mesmas cerca de duas semanas antes do parto para a ambientação a nova caixa moradia.

Em cada sessão, o comportamento das ratas lactantes foi registrado a cada 3 minutos, contabilizando um total de 31 observações por período x 2 períodos por dia = 62 observações/rata/dia) (adaptado de VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014; CHAMPAGNE et al., 2003; CALDJI et al., 1998).

Os parâmetros comportamentais registrados foram divididos em maternais, onde observou-se ações que se caracterizam como cuidado da fêmea lactante com a prole e não maternais, onde observou-se a ausência de cuidado da fêmea lactante com a prole.

Figura 07- Visualização do comportamento materno em caixas transparentes.



Fonte: Da autora.

#### *Comportamento maternal:*

- a) porcentagem do número de vezes em que a rata fica sobre a ninhada em posição de amamentação (posição arqueada ou cifose);
- b) porcentagem do número vezes em que a rata fica sobre a ninhada sem estar em posição arqueada (sobre os *pups*);
- c) porcentagem do número vezes em que a rata fica em posição passiva (de barriga para cima) para a amamentação dos filhotes (passiva);
- d) porcentagem do número vezes de lambida nos filhotes (lambendo *pups*);
- e) porcentagem do número vezes construindo o ninho (construindo o ninho);
- f) porcentagem do número de vezes em que a rata lactante estimulou os mamilos para a amamentação (*self grooming* maternal).

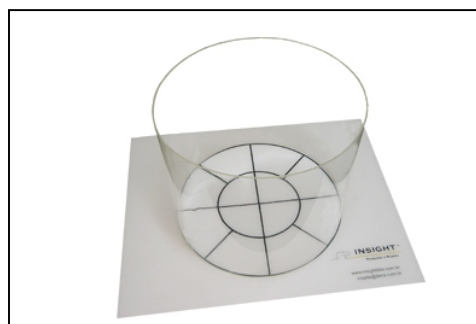
*Comportamento não maternal:*

- a) porcentagem de vezes em que a rata permanece fora do ninho e se alimentando (sem *pups* alimentando);
- b) porcentagem de vezes em que a rata permanece sem os filhotes e explorando o ambiente (sem *pups* explorando);
- c) porcentagem de vezes em que a rata permanece sem os filhotes e não explorando o ambiente (sem *pups* não explorando).

#### 4.6.2 Campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena circular de 60 cm de diâmetro e paredes com 50 cm de altura com o piso dividido em 12 quadrantes, dos quais 8 quadrantes junto às paredes da caixa foram considerados periferia e os 4 demais os centrais (figura 08). No 5º DL, a rata lactante foi colocada no centro da arena e filmada por cinco minutos. Foi avaliado o comportamento preditivo de redução da ansiedade das ratas lactantes considerando o número de cruzamentos com as quatro patas, no centro. Um aumento desse parâmetro indica um possível comportamento preditivo de redução de ansiedade da rata lactante (GOMES et al., 2008). Tipicamente os animais tendem a ficar por mais tempo na periferia em comparação com a área central. Essa preferência é conhecida como tigmotaxia e o inverso leva a um efeito anti-tigmotático que pode ser observado no campo aberto e pode ser referido como um comportamento preditivo de redução da ansiedade (VALLE, 1970). Este teste também foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais analisando o número de entradas com as quatro patas na periferia e o número total de cruzamentos. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 08- Campo aberto



Fonte: Insight

#### 4.6.3 Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz elevado consiste em um aparato com dois braços abertos e dois braços fechados, ligados por uma plataforma central (figura 09). No 6º DL, as ratas lactantes foram colocadas no centro do aparato, de frente para um dos braços fechados. O comportamento da rata lactante foi filmado durante 5 minutos, avaliando-se como parâmetros preditivos de ansiedade a frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados (BISON et al., 2009). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5%.

Figura 09- Labirinto em Cruz Elevado

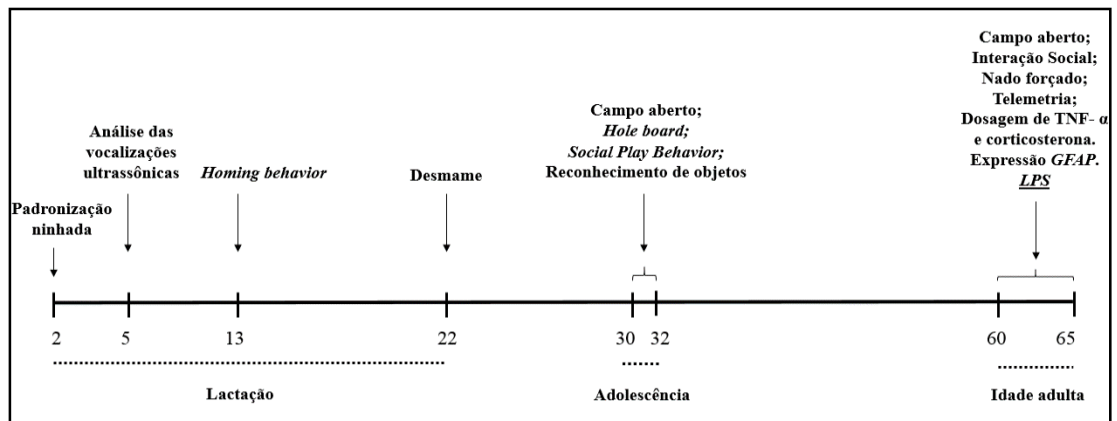


Fonte: Insight

#### 4.7 PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS E DIRECIONAMENTO DOS FILHOTES AOS TESTES COMPORTAMENTAIS DA LACTAÇÃO, ADOLESCÊNCIA E VIDA ADULTA

Visando facilitar a compreensão da ordem da realização dos experimentos dos filhotes na lactação, adolescência e idade adulta, a seguir é apresentado o delineamento experimental em linhas temporais.

Figura 10- Avaliação dos filhotes na lactação, adolescência e idade adulta.



Nota: Descrição temporal da realização dos experimentos com os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica ou hipoproteica na lactação, adolescência e idade adulta.

Fonte: Da autora.

No 2º DL as ninhadas provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica e hipoproteica foram padronizadas em 8 filhotes: 4 machos e 4 fêmeas para todas as ratas lactantes. Após o desmame (22ºDL) os filhotes machos e fêmeas foram separados, alojados em caixas individuais e alimentados com a dieta padrão do laboratório (22% de caseína). Estes animais foram utilizados para diferentes testes comportamentais durante a lactação e adolescência. Após os testes comportamentais realizados na adolescência, os filhotes machos foram mantidas no biotério para a realização dos testes comportamentais durante a idade adulta

#### 4.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS NA LACTAÇÃO E ADOLESCÊNCIA E DOS FILHOTES MACHOS ADULTOS

Após a confirmação da prenhez as ratas foram separadas em dois grupos de acordo com o tratamento com a dieta normoproteica ou hipoproteica que receberam durante toda a gestação e lactação. Após a padronização das ninhadas seguiu-se uma sequência temporal de testes comportamentais que se deu durante a lactação, adolescência e vida adulta dos filhotes. A formação dos grupos experimentais em cada fase temporal está descrita a seguir:

##### 4.8.1 Lactação e adolescência

Na lactação e adolescência os testes comportamentais constituíram-se de dois grupos experimentais com os filhotes machos e fêmeas provenientes das mães alimentadas com a dieta normoproteica ou hipoproteica:

Grupo 1 - Filhotes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica, designados de **DN**.

Grupo 2 - Filhotes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica, designados de **DH**.

Ambos os grupos foram direcionados às seguintes avaliações:

- a) avaliação do número de vocalizações ultrassônicas: n = 8 animais por grupo;
- b) avaliação da performance comportamental no teste de *Homing Behavior*: = 8 – 9 animais por grupo;
- c) avaliação da performance comportamental no teste da placa com buracos: n = 8 – 9 animais por grupo;
- d) avaliação da performance comportamental no teste do comportamento juvenil de brincadeira: 8 animais por grupo;
- e) avaliação da performance comportamental no teste de reconhecimento de Objetos: n= 8 animais por grupo;
- f) avaliação da performance comportamental no teste de *campo aberto*: n = 8 animais por grupo.

#### 4.8.2 Filhotes machos adultos

Com o objetivo de avaliar as respostas comportamentais, neuroendócrinas e neuroinflamatórias dos filhotes machos adultos frente ao desafio imunológico com LPS, foram constituídos quatro grupos experimentais como descritos a seguir:

Grupo 1 - Filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica e injetados com salina, designados de **DN, (DN+S)**.

Grupo 2 - Filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica e injetados com LPS, designados de **DN, (DN+LPS)**.

Grupo 3 - Filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica e injetados com salina, designados de **DH, (DH+S)**.

Grupo 4 - Filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica e injetados com LPS, designados de **DH, (DH+LPS)**.

Todos os grupos foram direcionados às seguintes avaliações:

- a) avaliação da performance comportamental no teste de campo aberto (2 e 6 horas após administração do LPS): n = 10 - 12 animais por grupo;
- b) avaliação da performance comportamental no teste de interação social (2 e 6 horas após administração do LPS): n = 9 - 10 animais por grupo;
- c) avaliação da performance comportamental no teste de nado forçado (2 e 6 horas após administração do LPS): n = 10 - 11 animais por grupo;
- d) avaliação da temperatura corpórea por telemetria: n = 10 - 11 animais por grupo;
- e) avaliação dos níveis plasmáticos de TNF-  $\alpha$  (2 e 6 horas após administração do LPS): n = 10 - 11 animais por grupo;
- f) avaliação dos níveis plasmáticos de corticosterona (2 e 6 horas após administração do LPS): n = 8 animais por grupo;
- g) avaliação da expressão hipotalâmica da Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), (2 e 6 horas após administração do LPS): n = 4 - 6 animais por grupo.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA

O peso da ninhada foi registrado a cada 3 dias durante a lactação desde o dia pós-natal 2 (PND 2) até o PND 20. Os pesos foram registrados sempre no período na manhã, (10h00min – 11h00min horas). Foram formados dois grupos experimentais (DN e DH) como descrito anteriormente constituídos de 11 - 12 animais por grupo.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA VOCALIZAÇÃO E DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A LACTAÇÃO

De modo aleatório, um casal (1 macho e 1 fêmea) de cada rata lactante foi utilizado para análise da vocalização ultrassônica (VUS) no dia pós-natal 5 - DPN 5, e outro casal (1

macho e 1 fêmea) de cada rata lactante foi utilizado para avaliação comportamental no teste de *homing behavior* no DPN 13.

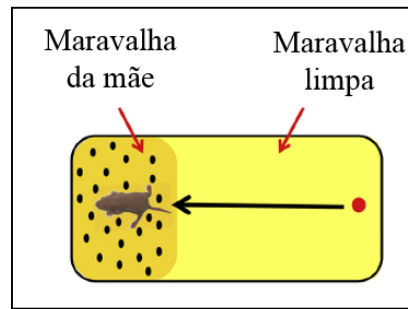
#### 4.10.1 Vocalizações ultrassônicas (VUS)

No DPN 5, um filhote macho e fêmea de cada rata lactante foram avaliados para o monitoramento da VUS. Cada filhote foi separado de sua ninhada, um de cada vez, e colocado em uma caixa com temperatura controlada (30°C) por 10 minutos. Em seguida, o filhote foi colocado em uma câmara à prova de som em um recipiente de acrílico raso e posicionado na câmara abaixo de um microfone conectado a um sistema de aquisição computadorizado (ML 221 *PowerLab*, *ADInstruments*, Bella Vista, NSW, Austrália) para detectar as VUSs a 40-100 kHz. Os sons foram registrados por 4 minutos, e o número total de VUSs foram analisados posteriormente (BATISTA et al., 2016). A câmara à prova de som e o recipiente de acrílico raso foi cuidadosamente limpo com uma solução de 5% de álcool após cada teste.

#### 4.10.2 Homing Behavior

O teste de *homing behavior* fornece uma medida de discriminação social e habilidade cognitiva, sensorial e motora dos filhotes necessárias para discriminar entre o odor da maravalha da mãe e da maravalha limpa (BIGNAMI, 1996; SERVADIO; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015). No DPN 13, um filhote macho e fêmea de cada rata lactante foram separados das mães e mantidos durante 30 min em uma sala com temperatura controlada (25°C). Após esse período, cada filhote foi colocado em uma caixa cujo chão foi coberto por 1/4 com maravalha da mãe, e por 3/4 com maravalha limpa (figura 11). O filhote foi posicionado no lado da caixa que estava coberto por maravalha limpa e seu comportamento foi analisado por 4 minutos em tempo real. Os seguintes parâmetros foram registrados: latência em segundos para atingir a área com maravalha da mãe, tempo total em segundos gasto pelo filhote na área de maravalha da mãe e número total de entradas na área de maravalha da mãe (MELANCIA et al., 2017).



Figura 11- *Homing behavior*.

Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A ADOLESCÊNCIA

Após o desmame, os animais foram mantidos em um número de 4 animais por caixa, separados por sexo até atingir a adolescência (PND30 - PND32). Para evitar que o mesmo animal fosse submetido a 2 testes, um casal (1 macho e 1 rato fêmea) de cada rata lactante recebeu uma marca de tinta em um membro posterior com cores diferentes e cada casal foi usado apenas uma vez em cada teste para avaliação do desempenho comportamental nos seguintes testes: campo aberto, teste da placa com buracos (hole board), comportamento juvenil de brincadeira e teste de reconhecimento de objetos (LAZIC; ESSIOUX, 2013; VERONESI, 2016).

##### 4.11.1 Teste de campo aberto

A atividade locomotora foi avaliada em uma caixa de campo aberto quadrada de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm). Quatro quadrados centrais foram definidos como o centro e oito quadrados ao longo das paredes foram considerados periféricos. No DPN 30-32, cada rato foi colocado cuidadosamente no centro da caixa e filmado durante 5 minutos para análises comportamentais subsequentes usando o programa *EThoVision XT 9.0*, um sistema de observação computadorizado que é capaz de realizar rastreamento, análise e reconhecimento

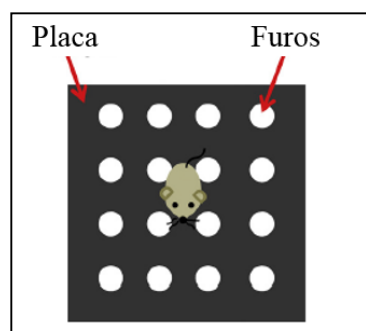
comportamental por meios de vídeos (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001). Foram analisados a distância total percorrida em centímetros e o tempo em segundos de imobilidade. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

#### 4.11.2 Teste da placa com buracos

O teste da placa com buracos avalia padrões repetitivos de imersão da cabeça na placa com buracos que são considerados comportamentos repetitivos e estereotipados (MAKANJUOLA et al., 1997).

O aparato da placa com buracos consiste em uma arena quadrada (40 cm x 40 cm) com fundo preto e 16 furos com três cm de diâmetro cada (figura 10). No DPN 30-32, os ratos foram colocados individualmente no aparato e seu comportamento foi filmado durante 5 minutos para posterior análise comportamental. O parâmetro medido através da filmagem foi o número de imersão com a cabeça em cada furo (o animal mergulhou a cabeça até o terço médio da orelha encobrendo os olhos) nos orifícios da placa (SERVADIO et al., 2016). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 12- Placa com buracos



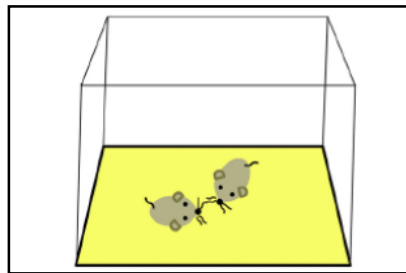
Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018.

#### 4.11.3 Teste do comportamento juvenil de brincadeira.

O teste do comportamento juvenil de brincadeira foi realizado em uma caixa quadrada de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm). Os ratos foram individualmente habituados à caixa de teste durante 10 minutos por 3 dias antes do experimento. No dia do teste (PND 30-

32), os animais foram isolados por 3h30min antes do teste para aumentar sua motivação social e assim facilitar a expressão do comportamento juvenil de brincadeira (TREZZA; VANDERSCHUREN; 2008; TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2009). O teste consistiu em colocar dois animais pertencentes ao mesmo grupo experimental na arena de teste durante 10 minutos e as interações do comportamento juvenil de brincadeira foram então registradas para posterior análise. Os parâmetros analisados foram: (1) tempo em segundos gasto em exploração social - cheirando qualquer parte do corpo do parceiro de teste, incluindo a área anogenital; (2) tempo em segundos de *following* - avançando na direção ou seguindo o outro animal, que se afasta. Com o objetivo de reduzir as interferências nas respostas comportamentais, os animais em pares não diferiram mais de 10 g no peso corporal e não apresentaram experiência social anterior (MELANCIA et al., 2017).

Figura 13- Comportamento juvenil de brincadeira



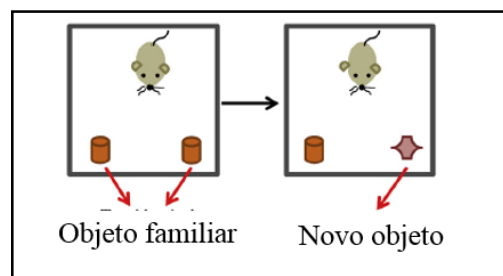
Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018

#### 4.11.4 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos avalia a habilidade do roedor em reconhecer um objeto previamente explorado na presença de um novo objeto não conhecido (REGGER; HOVDA; GIZA, 2009). Dois dias antes do teste, os animais foram expostos a caixa teste (10 minutos) para a habituação para garantir que os animais passem quantidade suficiente de tempo explorando os objetos e não o ambiente (ANDERSON et al., 2004). O teste foi realizado no DPN 30-32 em uma arena quadrada (40 cm x 40 cm) com o chão coberto com maravalha. No dia do teste os animais foram apresentados a 2 objetos idênticos (A e B) durante 10 minutos (treinamento), 2 horas após, um dos objetos de treinamento A ou B (objeto familiar) foi substituído por um novo objeto C (objeto novo). Todos os objetos apresentaram texturas e tamanhos semelhantes, mas formas distintas. Os ratos machos e fêmeas foram colocados

individualmente na arena e seu comportamento foi filmado por 10 minutos para análise subsequente. A exploração foi definida da seguinte forma: quando o animal cheirou ou tocou o objeto com o focinho. O tempo gasto pelo animal explorando os dois objetos (objeto familiar ou novo) foi tomado como uma medida de exploração de objetos. Um índice de reconhecimento (RI) foi calculado para cada animal e foi expresso pela razão:  $IR = TN / (TF + TN)$ , TF = tempo gasto explorando o objeto familiar (objeto A ou B); TN = tempo gasto explorando o novo objeto (objeto C) (RECH et al., 2010; ANDERSON et al., 2004; MELANCIA, et al., 2017). Entre os testes, os objetos e a arena foram devidamente limpos.

Figura 14- Teste de reconhecimento de objetos



Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018.

#### 4.12 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO NOS FILHOTES MACHOS ADULTOS

Durante a idade adulta (60 - 65 DPN) somente os filhotes machos foram analisados quanto a influência da restrição proteica durante a gestação e lactação sobre o comportamento doentio induzido por LPS. O LPS - lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (026:B6 – Sigma Aldrich, (USA) foi utilizado na dose de 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (i.p.) para os filhotes machos adultos. Esta dose foi estabelecida no nosso laboratório e já é conhecida por induzir o comportamento doentio em ratos (ORLANDI et al., 2015). Como veículo utilizou-se salina estéril (0,9% NaCl; 1ml/Kg; i.p.). Os experimentos relacionados aos filhotes machos adultos foram conduzidos após 2 ou 6 horas da aplicação de salina ou LPS. Assim, durante a idade adulta os animais foram divididos em 4 grupos experimentais como já descrito anteriormente, sendo:

Grupo 1 - Filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica (DN) e tratados com salina (0.9% NaCl; 1 ml/kg; i.p.): **DN + S**;

Grupo 2 - Filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica (DN) e tratados com LPS (1000 $\mu$ g/Kg; i.p.): **DN + LPS**;

Grupo 3 - Filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica (DH) e tratados com salina (0.9% NaCl; 1 ml/kg; i.p.): **DH + S**;

Grupo 4 - Filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica (DH) e tratados com LPS (1000 $\mu$ g/Kg; i.p.): **DH + LPS**.

Todos os grupos foram direcionados às seguintes avaliações: avaliação da performance comportamental no teste de campo aberto, avaliação da performance comportamental no teste de interação social, avaliação da performance comportamental no teste de nado forçado, avaliação da temperatura corporal por telemetria, dosagem de TNF- $\alpha$ , dosagem de corticosterona plasmática e avaliação da expressão de GFAP no hipotálamo.

Os testes comportamentais seguidos da avaliação da temperatura corporal, dosagem de TNF- $\alpha$ , dosagem de corticosterona plasmática e expressão de GFAP no hipotálamo são descritos a seguir:

#### 4.12.1 Campo aberto

Como já descrito anteriormente, o campo aberto consiste em uma arena circular de 60 cm de diâmetro e paredes de 50 cm de altura com o piso dividido em 12 quadrantes, dos quais 8 quadrantes junto às paredes da caixa foram considerados periferia e os 4 demais os centrais.

Os ratos machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica (DN + S ou DN + LPS) e hipoproteica (DH + S ou DH + LPS) foram colocados, individualmente, no centro da caixa e filmados por cinco minutos. Como parâmetro foi avaliado o comportamento preditivo de ansiedade dos filhotes machos adultos considerando o número de cruzamentos com as quatro patas, no centro. Um aumento desse parâmetro indica um possível comportamento preditivo de redução da ansiedade (GOMES et al., 2008). Tipicamente os animais tendem a ficar por mais tempo na periferia em comparação com a área central. Essa preferência é conhecida como tigmotaxia e o inverso leva a um efeito anti-tigmotático que pode ser observado no campo aberto e pode ser referido como um comportamento de redução da ansiedade (VALLE, 1970). Este teste também foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais analisando o número de entradas com as quatro patas na periferia e o total de cruzamentos. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5%.

#### 4.12.2 Interação social

O teste de interação social consistiu no confronto entre o animal teste (animal residente) e um animal da mesma espécie, porém, peso inferior (aproximadamente 100g a menos) considerado como animal intruso. Para tanto, os animais provenientes de mães normoproteicas (DN + S ou DN + LPS) e hipoproteicas (DH + S ou DH + LPS) foram colocados na arena de campo aberto e a interação entre residente e intruso foi registrada por uma câmera durante 10 minutos. Para evitar que o comportamento exploratório atrapalhasse a exibição do comportamento de interação social, o animal residente foi ambientado à arena do campo aberto por 3 dias consecutivos, anteriores ao dia do teste, por um período de 10 minutos.

O animal residente foi isolado 24 horas antes do teste, este procedimento é necessário para que ocorra um aumento da motivação social e facilitação do comportamento social durante o teste (MANDUCA, et al., 2015). Os parâmetros analisados no animal residente foram: *sniffin* - quando o animal residente cheira a região anogenital do intruso e *following* - quando o animal residente segue o intruso. Os vídeos foram analisados e o tempo total de interação entre residente e intruso foram contabilizados (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2014).

#### 4.12.3 Nado forçado

Um dia antes da realização do teste de nado forçado os animais provenientes de mães normoproteicas (DN + S ou DN + LPS) e hipoproteicas (DH + S ou DH + LPS) foram colocados para nadar (pré-teste), um por vez, por 15 minutos, em um cilindro plástico (24 cm de diâmetro por 60 cm de altura contendo 50 cm de água a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , (PADOVAN; GUIMARÃES 2004). Em seguida, eles foram removidos do cilindro com água, secos cuidadosamente com toalha de algodão, e deixados em gaiolas individuais até se secarem completamente antes de serem devolvidos as caixas de moradia. No dia seguinte, exatamente 24 horas após a sessão de pré-teste, os animais, um por vez, foram submetidos novamente a sessão de nado forçado e filmados por 5 minutos para análises posteriores. Os parâmetros analisados em seguida foram: latência (s) para o primeiro episódio de imobilidade, tempo (s) de imobilidade, latência (s) para o primeiro episódio de climbing, tempo (s) de climbing. Após o experimento com cada animal a

água foi trocada para evitar a influência de substâncias de alarme (ABEL; BILITZKE, 1990; Adaptado de JOCA; GUIMARÃES, 2006).

#### 4.12.4 Monitoramento da temperatura corporal por telemetria dos filhotes machos adultos

Cada animal proveniente de mães normoproteicas (DN + S ou DN + LPS) e hipoproteicas (DH + S ou DH + LPS) tiveram um transmissor de biotelemetria (série 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR), implantado na cavidade peritoneal que transmitiu sinais, a cada um minuto, para uma placa receptora acoplada a um computador. O acesso a cavidade peritoneal foi possível por meio de laparotomia de aproximadamente 2cm no abdômen, com os animais sob efeito de anestésico injetável (tribromoetanol 250 mg/Kg-TBE, i.p.; Sigma Aldrich, Brasil). Após o implante do transmissor a incisão foi fechada por meio de aproximadamente três pontos internos feitos no tecido muscular e três externos feitos no tecido epitelial, em seguida administrou-se antibiótico (Pentabiótico; Fort Dodge, Brasil). Os animais foram mantidos em uma caixa com temperatura controlada (32° C) até a completa recuperação da anestesia. Em seguida estes foram isolados em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida (CLEMENT; MILLS; BROCKWAY, 1989).

Após a inserção do sensor e completa recuperação dos animais (4 ou 5 dias após cirurgia), eles foram posicionados sobre uma placa receptora (Data Sciences) para coleta da temperatura interna e receberam administração de salina ou LPS. As informações foram coletadas durante 24 horas e repassadas para o software (*Vital View, Mini Mitter*), que armazenou os dados, sendo que somente os animais que apresentavam-se com temperatura corporal inferior a 37,5 ° C foram submetidos ao teste.

Para determinação da temperatura basal calculou-se a média das temperaturas aferidas 60 minutos antes da primeira administração e a diferença entre a temperatura basal média e a temperatura obtida a cada intervalo foi calculada para obtenção da variação de temperatura (delta) (CRUNFLI; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

#### 4.12.5 Dosagem de TNF- $\alpha$

Os animais provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica (DN + S ou DN + LPS) e hipoproteica (DH + S ou DH + LPS), foram tratados (i.p) com salina ou LPS e após 2 ou 6 horas foram decapitados para coleta do sangue (5 ml) em tubos heparinizados. Imediatamente após a coleta o sangue foi centrifugado a uma rotação de 3000 rpm a 4°C por 15 minutos para separação do plasma que foi armazenado a -80°C até o dia da dosagem de TNF- $\alpha$ . A concentração plasmática de TNF- $\alpha$  foi mensurada através de ensaio enzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) usando kits comerciais (Peprotech, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

#### 4.12.6 Dosagem de corticosterona

Para a coleta de sangue foram utilizados os mesmos animais que passaram pelo teste de interação social, assim, imediatamente após este teste, os animais provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica (DN + S ou DN + LPS) e hipoproteica (DH + S ou DH + LPS) foram cuidadosamente transferidos para outra sala onde foram decapitados e o sangue foi coletado do tronco (5 mL), em tubos plásticos heparinizados, mantidos sob gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

Antes da dosagem hormonal, as amostras foram liofilizadas. Para isto, as amostras descongeladas, agitadas uma por vez por 30 segundos, em seguida 25  $\mu$ l do plasma foi adicionado em um tubo de vidro contendo 1 ml de etanol seguido novamente de agitação de uma amostra por vez por 15 segundos. Em seguida as amostras foram mantidas em freezer a (-20°C, por 30 minutos) e posteriormente foram submetidas a centrifugação (4000 rpm, 4°C por 20 minutos). O sobrenadante foi vertido em outro tubo devidamente identificado e submetido a liofilização (*Labconco, Centrizap*). A dosagem de corticosterona foi realizada utilizando-se a técnica de radioimunoensaio, que foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela prof. Dr. Bruna Kalil.

#### 4.12.7 Avaliação da expressão proteica de GFAP por *Western Blotting*



Um grupo de animais, após o teste de nado forçado, foram utilizados para a análise da expressão de *GFAP* por *Western Blotting*. Para isso, após o teste de nado forçado, os animais foram mortos por decapatação, e imediatamente depois o hipotálamo foi dissecado e armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização do teste de Bradford. Para a realização do teste de Bradford as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida as amostras foram centrifugadas (9200 rpm, 15 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e a concentração de proteínas no sobrenadante foi quantificada pelo teste de Bradford.

As amostras contendo o tampão de lise juntamente com *Laemmli* foram fervidas e submetidas a análise de *Western blotting*. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 12% (electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) e em seguida transferidas para membranas de nitrocelulose com um sistema electroforético semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA). A membrana foi lavada 3 vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20, bloqueada com 5% de leite desnatado em PBS durante 2 h à temperatura ambiente e depois incubadas *overnight*, a  $4^{\circ}\text{C}$  com um anticorpo anti-GFAP (1:1000, Santa Cruz-sc 33673). No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS contendo 0,05% de Tween 20, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário específico (1:2000, Abcam-ab 6789). Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05% e depois aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA). Posteriormente as membranas passaram pelo processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 h. Após o bloqueio as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, seguida da incubação *overnight*, a  $4^{\circ}\text{C}$  com anticorpo anti-actina (1:5000, sigma aldrich 4700). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, e as membranas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário (1:2000, Abcam-ab 6789). Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, em seguida aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades de banda foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad.

A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da  $\beta$ -actina e os dados foram expressos normalizados para o controle.

#### 4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *Graph Pad Prism* versão 6.0 e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os resultados foram analisados pelo Teste *t Student* para comparação de 2 grupos ou *Two-way ANOVA* seguida pelo pós-teste de *Bonferroni* para comparação de 2 fatores (dia e tratamento ou pré-tratamento e tratamento).

Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que  $p < 0.05$ .

## 5 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo consistem em diferentes etapas cronológicas descritas a seguir:

- a) avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob o ganho de peso, ingestão de ração e água das ratas gestantes e lactantes e sob a performance comportamental das ratas lactantes;
- b) avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob o ganho de peso da ninhada durante a lactação, vocalização e performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas durante a lactação;
- c) avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas durante a adolescência;
- d) avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob o comportamento doentio induzido por LPS nos filhotes machos adultos;
- e) avaliação os efeitos da restrição proteica materna sob a resposta febril induzida por LPS nos filhotes machos adultos;
- f) avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob os níveis plasmáticos de TNF-  $\alpha$  nos filhotes machos adultos submetidos ao desafio imunológico com LPS.
- g) avaliação os efeitos da restrição proteica materna sob os níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos adultos submetidos ao desafio imunológico com LPS.
- h) avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob a expressão hipotalâmica da Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) nos filhotes machos adultos submetidos ao desafio imunológico com LPS.

### 5.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O GANHO DE PESO, INGESTÃO DE RAÇÃO E ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

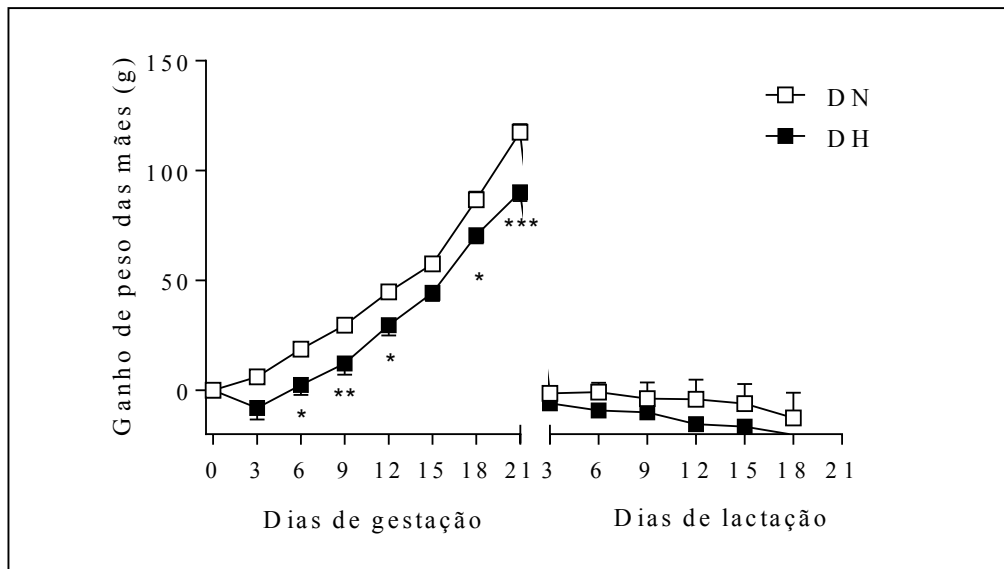
#### 5.1.1 Ganho de peso

No período gestacional (figura 15), observa-se que a partir do 6º DG houve redução do ganho de peso das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando

comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica ( $p < 0.05$ ), esta redução do ganho de peso se manteve até o 12º DG: 6ºDG ( $p < 0.05$ ), 9ºDG ( $p < 0.01$ ) e 12ºDG ( $p < 0.05$ ), no dia 15º não foi observada alteração no ganho de peso das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica em relação as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica ( $p > 0.05$ ). Nos dias 18º e 21º DG as ratas alimentadas com a ração normoproteica voltaram a apresentar uma redução do ganho de peso quando comparadas ao seu controle ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , respectivamente).

Com relação a lactação (Figura 15), observou-se que não houve alteração no ganho de peso em nenhum dos dias de lactação entre os grupos analisados ( $p > 0.05$ ), (análise estatística: tabela 03).

Figura 15- Efeitos da restrição proteica materna sobre o ganho de peso das ratas durante a gestação e lactação



Nota: N= 12 animais por grupo. Variação do ganho de peso durante a gestação e lactação, DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 3- Análise de variância de duas vias do ganho de peso referentes aos períodos de gestação e lactação.

	Tratamento	Dia	Interação
Gestação	$F_{1,154} = 73.490, p < 0.001$	$F_{6,154} = 204.9, p < 0.001$	$F_{6,154} = 0.081, p > 0.05$
Lactação	$F_{1,132} = 5.736, p < 0.05$	$F_{5,132} = 1.274, p > 0.05$	$F_{5,132} = 0.090, p > 0.05$

### 5.1.2 Ingestão de ração e água

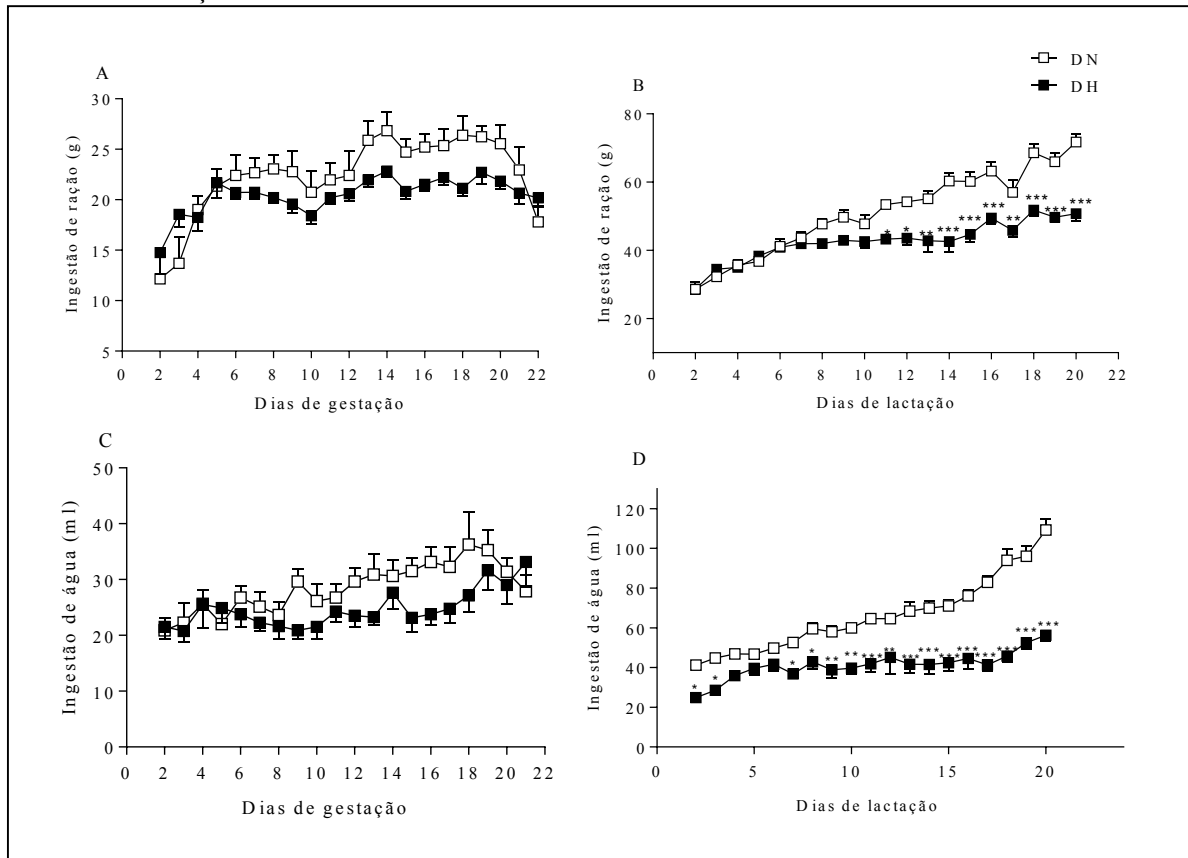
Com relação a ingestão de ração durante a gestação (figura 16 A) não houve alteração na ingestão diária de ração das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica ( $p > 0.05$ ) desde o 2º DG até o 22ºDG.

Já na ingestão diária de ração durante a lactação (figura 16 B), pode-se observar que houve uma redução na ingestão diária de ração das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica desde o 11º DG até o 20º DG: 11º DG ( $p < 0.05$ ); 12º DG ( $p < 0.05$ ); 13º DG ( $p < 0.01$ ); 14º ( $p < 0.001$ ); 15º ( $p < 0.001$ ); 16º ( $p < 0.001$ ); 17º DG ( $p < 0.01$ ); 18º ( $p < 0.001$ ); 19º ( $p < 0.001$ ) e 20º ( $p < 0.001$ ).

Na ingestão diária de água durante a gestação (figura 16 C) não houve alteração em relação as ratas alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica ( $p > 0.05$ ) desde o 2º DG até o 22ºDG.

Já na análise da ingestão diária de água durante a lactação (figura 16 D) houve redução na ingestão diária de água das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica nos dias: 2º DG ( $p < 0.05$ ); 3ºDG ( $p < 0.05$ ); 7ºDG ( $p < 0.05$ ); 8ºDG ( $p < 0.05$ ); 9ºDG ( $p < 0.01$ ); 10ºDG ( $p < 0.01$ ); 12ºDG ( $p < 0.01$ ); 13ºDG ( $p < 0.001$ ); 14ºDG ( $p < 0.001$ ); 15ºDG ( $p < 0.001$ ); 16ºDG ( $p < 0.001$ ); 17ºDG ( $p < 0.001$ ); 18ºDG ( $p < 0.001$ ); 19ºDG ( $p < 0.001$ ) e 20ºDG ( $p < 0.001$ ); com excessão do 4º, 5º e 6ºDG onde não foram observadas alterações na ingestão diária de água das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica, (análise estatística: tabela 04).

Figura 16- Efeitos da restrição proteica materna sobre a ingestão de ração e de água durante a gestação e lactação



Nota: N= 11 - 12 animais por grupo. A) Ingestão de ração durante a gestação, B) Ingestão de ração durante a lactação, C) Ingestão de água durante a gestação, D) Ingestão de água durante a lactação, DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 04- Análise de variância de duas vias da ingestão diária de ração e água referentes aos períodos de gestação e lactação.

	Tratamento	Dia	Interação
Ingestão de ração: DG	$F_{1,441} = 18.03, p < 0.001$	$F_{20,441} = 7.613, p < 0.001$	$F_{20,441} = 1.534, p > 0.05$
Ingestão de ração: DL	$F_{1,133} = 141.0, p < 0.001$	$F_{18,133} = 48.380, p < 0.001$	$F_{18,133} = 5.449, p < 0.001$
Ingestão de água: DG	$F_{1,280} = 16.47, p > 0.001$	$F_{19,280} = 2.779, p < 0.001$	$F_{19,280} = 0.997, p > 0.05$
Ingestão de água: DL	$F_{1,265} = 456.6, p > 0.001$	$F_{18,265} = 24.30, p < 0.001$	$F_{18,265} = 6.853, p < 0.001$

## 5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB A PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DE RATAS LACTANTES

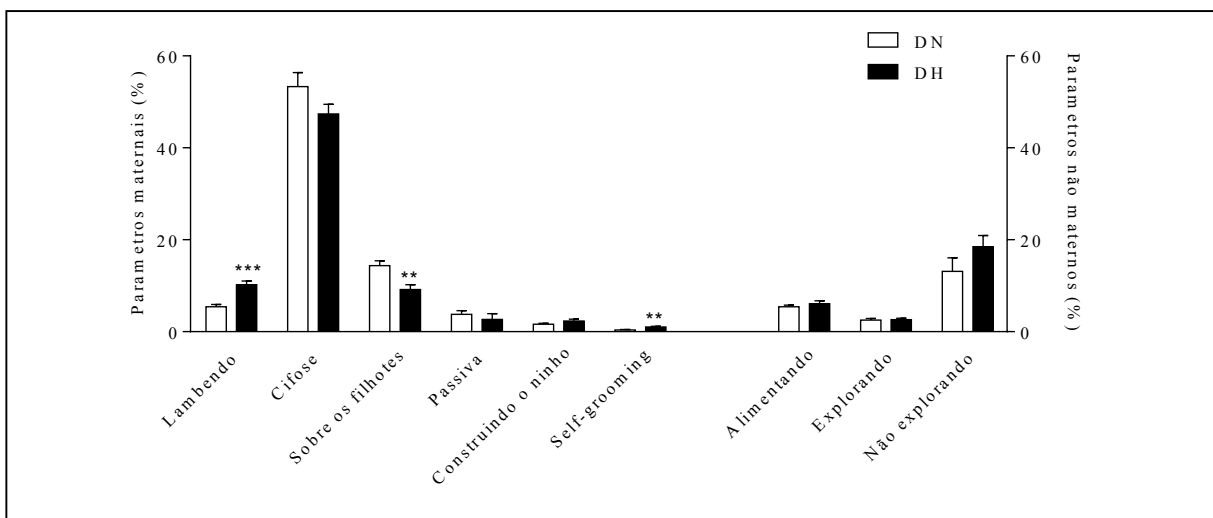
### 5.2.1 Avaliação da porcentagem do comportamento materno e não materno na primeira semana de lactação

A figura 17 mostra a porcentagem dos parâmetros maternos de lambida, cifose, sobre os filhotes, posição passiva, construindo o ninho e *self-grooming* e dos parâmetros não maternos de alimentação, exploração e não exploração de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação quando comparadas as ratas alimentadas com a ração normoproteica. Os dados foram obtidos a partir do somatório das observações das 2 análises diárias na primeira semana e calculando-se a porcentagem de observações.

Houve aumento da porcentagem do parâmetro materno de lambida ( $p < 0.001$ ), redução do parâmetro sobre os filhotes ( $p < 0.01$ ) e aumento no *self-grooming* ( $p < 0.01$ ) das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica, já os parâmetros de cifose, passiva e construção do ninho não foram alterados ( $p > 0.05$ ).

Com relação aos parâmetros não maternos não foram observadas alterações nos parâmetros de alimentação, exploração e não exploração ( $p > 0.05$ ) das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica.

Figura 17- Efeitos da restrição proteica materna sobre a porcentagem do comportamento materno e não materno.



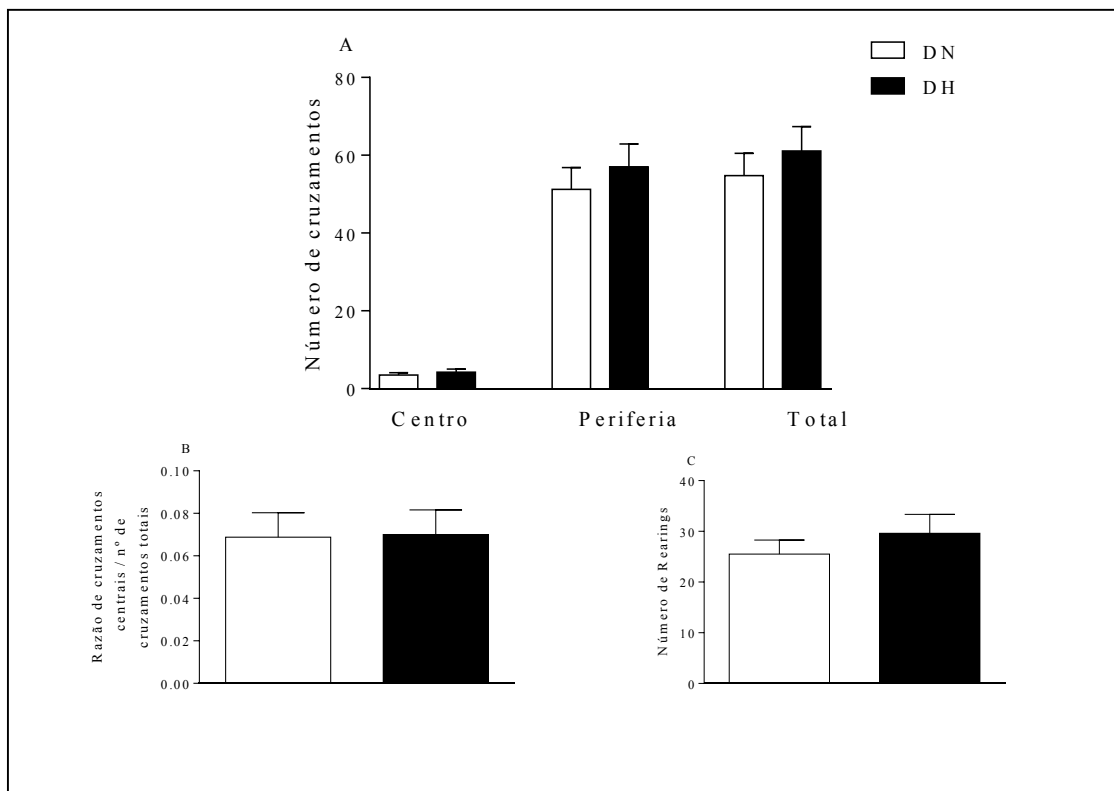
Nota: N= 8-11 animais por grupo. Avaliação da porcentagem do comportamento materno de lambida, cifose, sobre os filhotes, passiva, construção do ninho e *self-grooming* e do comportamento não materno de alimentação, exploração e não exploração. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos ao Teste *t* de Student com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

### 5.2.2 Campo aberto

Não foram encontradas alterações no número de cruzamentos centrais, periféricos e totais ( $p > 0.05$ ), (figura 18 A) entre os grupos experimentais analisados. Da mesma forma, não foram observadas alterações na razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais (figura 18 B) e no número de *rearings* (figura 18 C), ( $p > 0.05$ ), das ratas que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas que foram alimentadas com a ração normoproteica.

Figura 18- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental de ratas lactantes no teste de campo aberto.



Nota: N= 8 animais por grupo. A) Número de cruzamentos centrais, periféricos e totais, B) razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais e C) número de *rearings*. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os dados foram submetidos ao Teste *t* de Student com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora

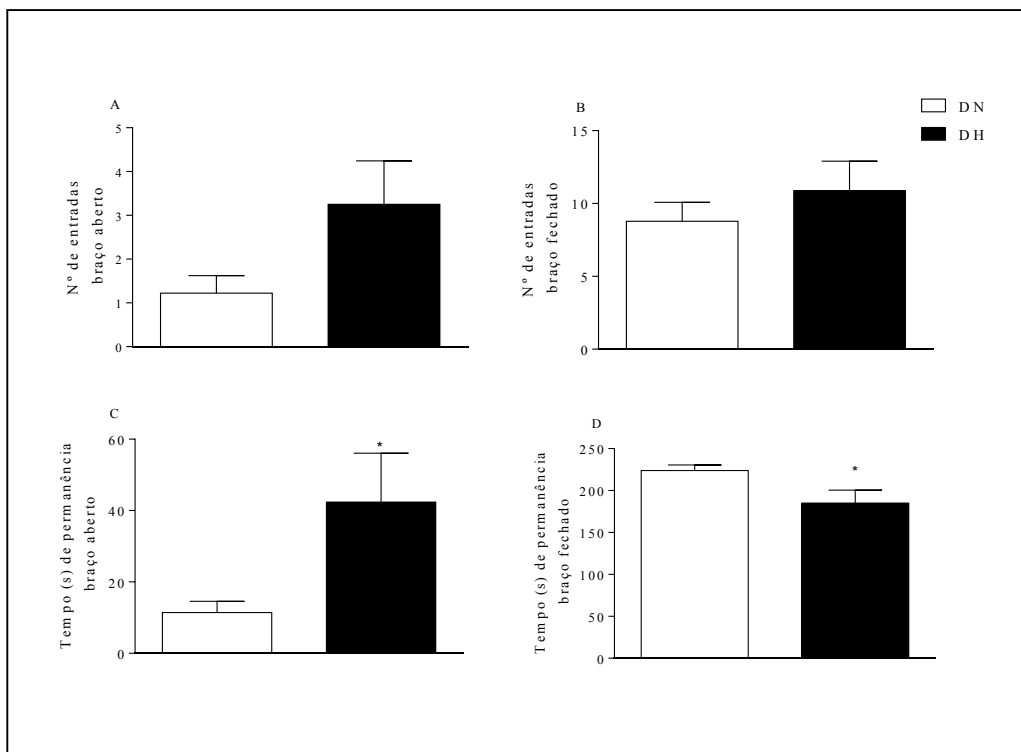
### 5.2.3 Labirinto em cruz elevado



Não houve diferença ( $p > 0.05$ ) no número de entradas nos braços abertos (figura 19 A), bem como no número de entradas nos braços fechados (figura 19 B) entre os grupos experimentais analisados.

Entretanto, o grupo alimentado com a ração hipoproteica apresentou um aumento ( $p < 0.05$ ) no tempo de permanência nos braços abertos (figura 19 C) e uma redução ( $p < 0.05$ ) no tempo de permanência nos braços fechados (figura 19, D) quando comparados ao grupo controle.

Figura 19- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental de ratas lactantes no teste de Labirinto em Cruz Elevado.



Nota: N= 8 animais por grupo. A) Número de entradas nos braços abertos, B) número de entradas nos braços fechados, C) tempo (s) de permanência nos braços abertos e D) tempo (s) de permanência nos braços fechados. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos ao Teste *t* de *Student* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora

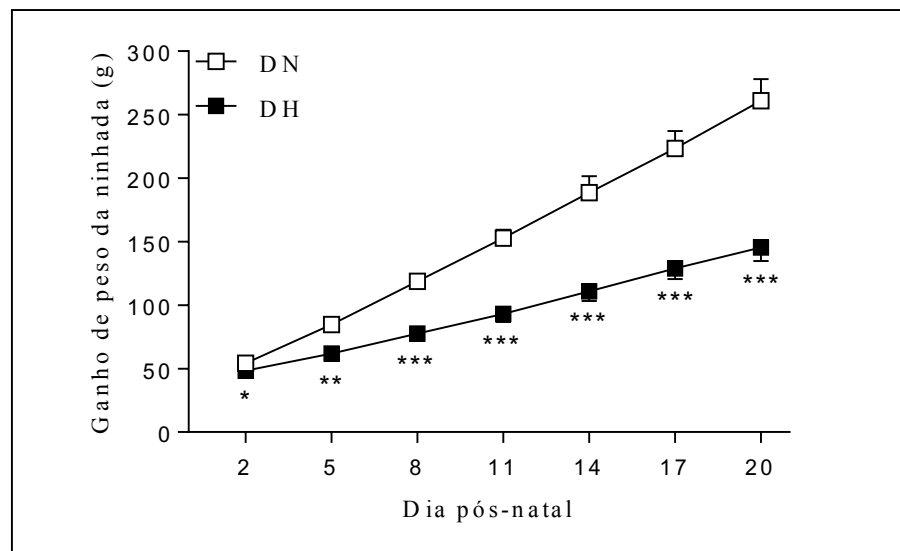
### 5.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O GANHO DE PESO DA NINHADA DURANTE A LACTAÇÃO, VOCALIZAÇÃO E PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A LACTAÇÃO

### 5.3.1 Ganho de peso da ninhada durante a lactação

A figura abaixo (figura 20), corresponde a análise do ganho de peso da ninhada, do 2ºDL ao 20ºDL.

Houve uma redução no ganho de peso da ninhada proveniente de mães que foram alimentadas com a ração hipoproteica quando comparados com a ninhada proveniente de mães alimentadas com a ração normoproteica nos dias 2º DG ( $p < 0.05$ ); 5ºDG ( $p < 0.01$ ); 8ºDG ( $p < 0.001$ ); 11ºDG ( $p < 0.001$ ); 15ºDG ( $p < 0.001$ ); 18ºDG ( $p < 0.001$ ); e 20ºDG ( $p < 0.001$ ) (análise estatística: tabela 05).

Figura 20- Efeitos da restrição proteica materna sob o ganho de peso da ninhada durante a lactação.



Nota: N= 11 - 12 ninhadas por grupo. Ganho de peso da ninhada durante a lactação, DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

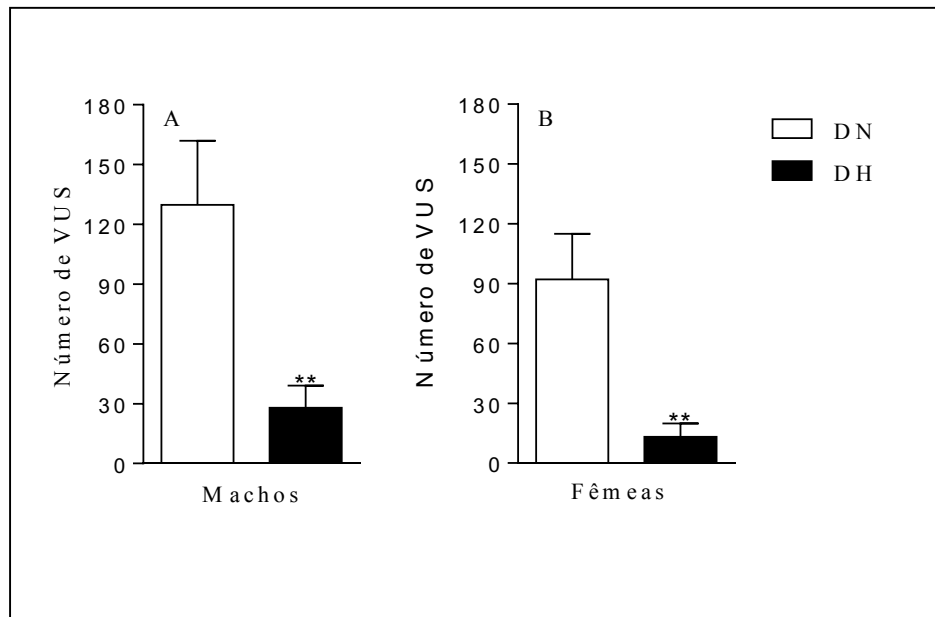
Tabela 05- Análise de variância de duas vias do ganho de peso da ninhada durante a lactação.

Pesos	Tratamento	Dia	Interação
	$F_{1,7} = 65.30, p < 0.001$	$F_{6,42} = 139.3, p < 0.001$	$F_{6,42} = 31.42, p < 0.001$

### 5.3.2 Vocalizações ultrassônicas

Os filhotes machos (figura 21, A) e fêmeas (figura 21, B) de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram uma diminuição do número de VUS ( $p < 0.01$ ) quando comparados aos filhotes machos e fêmeas de mães alimentadas com a ração normoproteica.

Figura 21- Efeitos da restrição proteica materna sob o número de vocalizações dos filhotes machos e fêmeas.



Nota: N= 8 -11 animais por grupo. A) Número de vocalizações ultrassônicas dos filhotes machos e B) Número de vocalizações ultrassônicas dos filhotes fêmeas. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \*\* $p < 0.01$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos ao Teste *t* de *Student* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora

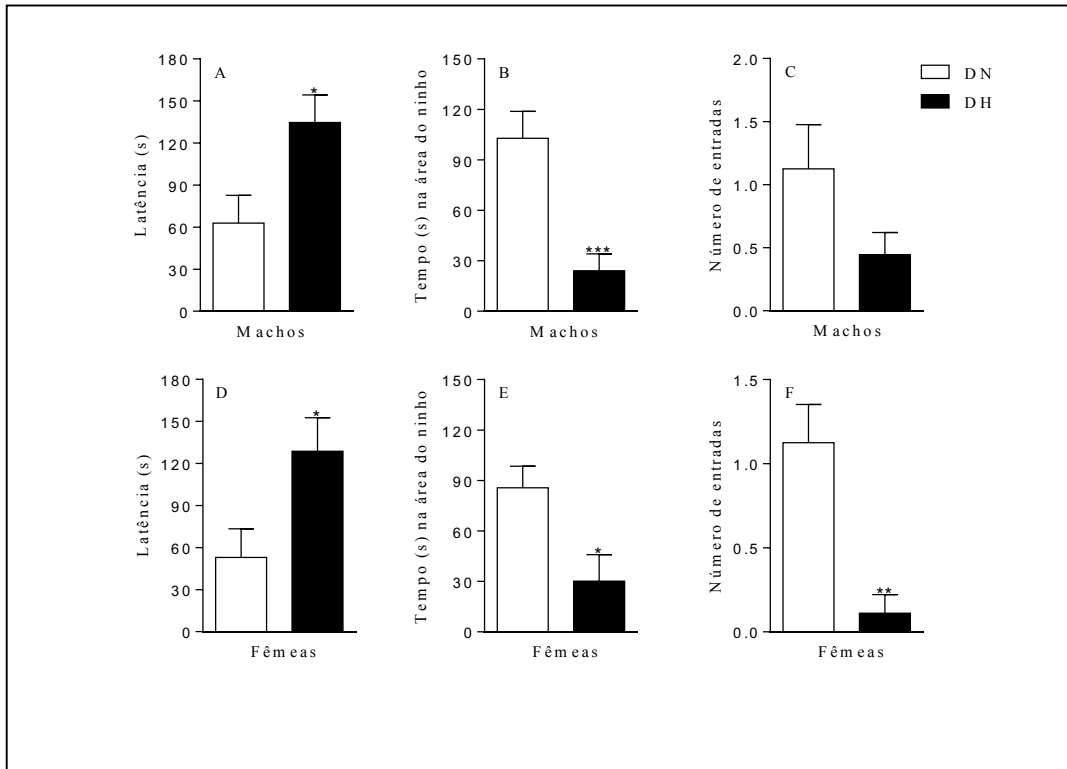
### 5.3.3 Homing behavior

Os filhotes machos provenientes de mãe alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram um aumento na latência para alcançar a área do ninho ( $p < 0.05$ ; figura 22 A) e uma diminuição no tempo gasto na área do ninho ( $p < 0.001$ ; Fig. 22 B) quando comparados aos filhotes machos provenientes de mães alimentadas com a ração normoproteica. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no número de entradas na área do ninho ( $p > 0.05$ ; Fig. 22 C).

Os filhotes fêmeas provenientes de mãe alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gravidez e lactação apresentaram um aumento na latência para alcançar a área do ninho ( $p <$

0.05; figura 22 D), diminuição no tempo gasto na área do ninho ( $p < 0.05$ ; Figura 22 E) e uma diminuição no número de entradas na área do ninho ( $p > 0.01$ ; Figura 22 F) quando comparados aos filhotes fêmeas de mães alimentadas com a ração normoproteica.

Figura 22- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de *homing behavior*.



Nota: N= 8 - 9 animais por grupo. A) Latência para alcançar a área do ninho (machos), B) Tempo (s) na área do ninho (machos), C) Número de entradas na área do ninho (machos), D) Latência para alcançar a área do ninho. (fêmeas), E) Tempo (s) na área do ninho (fêmeas) e F) Número de entradas na área do ninho (fêmeas). DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos ao Teste *t* de *Student* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

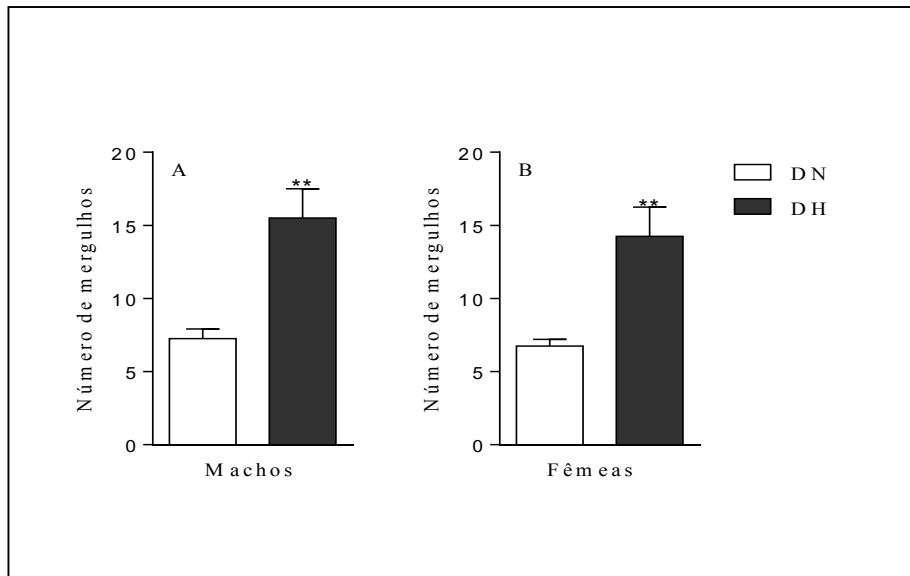
Fonte: Da autora

## 5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB A PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A ADOLESCÊNCIA

### 5.4.1 Teste da placa com buracos

Os filhotes machos e fêmeas provenientes de mãe alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram um aumento no número de mergulhos com a cabeça ( $p < 0.01$ ; Figura 23 A e Figura 23 B, respectivamente) quando comparados aos filhotes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a ração normoproteica, respectivamente.

Figura 23- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste da placa com buracos.



Nota: N= 8 - 9 animais por grupo. A) Número de mergulhos (machos) e B) Número de mergulhos (fêmeas). DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \*\* $p < 0.01$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos ao Teste *t* de Student com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora

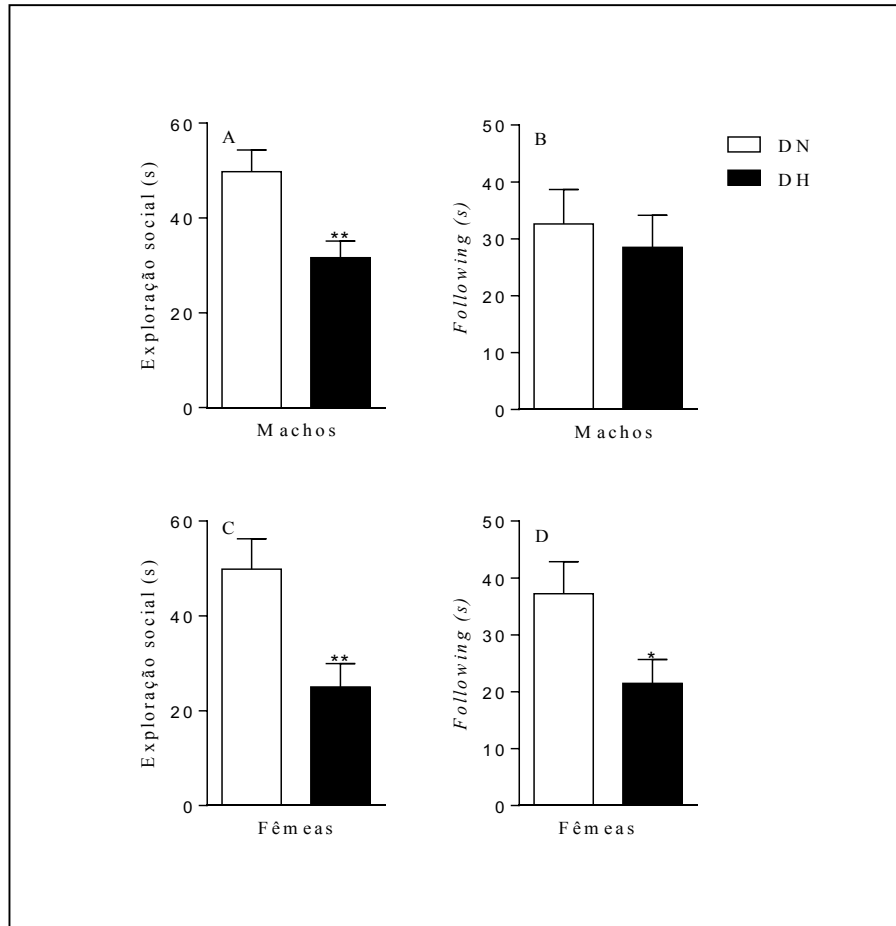
#### 5.4.2 Comportamento juvenil de brincadeira

Os filhotes machos provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram uma redução no tempo (s) de exploração social ( $p < 0.01$ ; Figura 24 A) quando comparados aos filhotes machos provenientes de mães alimentadas com a ração normoproteica. Não foram observadas alterações entre os grupos experimentais no tempo (s) *following* ( $p > 0.05$ ; Figura 24 B).

Os filhotes fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram uma redução no tempo (s) de exploração social ( $p$

<0.01; Fig. 24 C) e no tempo (s) *following* ( $p < 0.05$ ; Figura 24 D) quando comparadas aos filhotes fêmeas provenientes de mães alimentadas com a ração normoproteica.

Figura 24- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de brincadeira social.



Nota: N= 8 animais por grupo. A) Tempo (s) de exploração social, (machos), B) *Following* (machos), C) Tempo (s) de exploração social (fêmeas) e D) *Following* (fêmeas). DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância:  $p * < 0.05$  e  $**p < 0.01$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos ao Teste *t* de Student com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

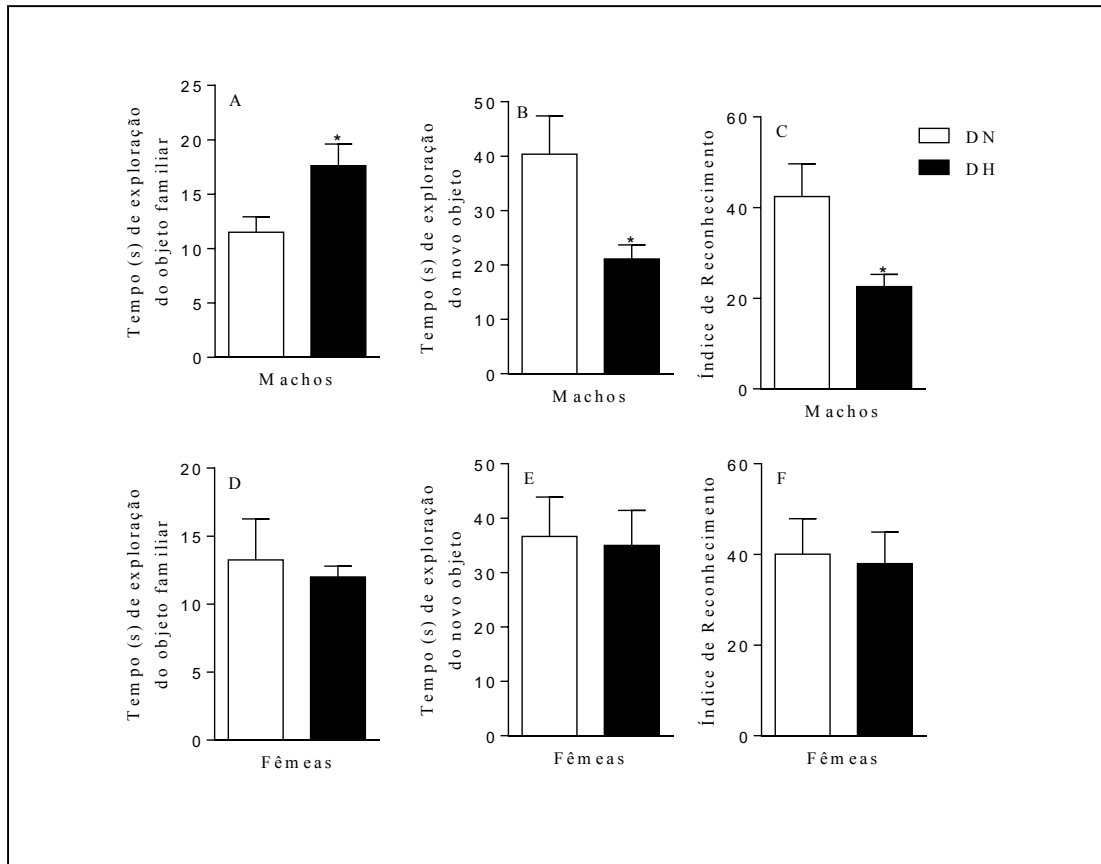
Fonte: Da autora

#### 5.4.3 Reconhecimento de objetos

Os filhotes machos provenientes de mãe alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram um aumento no tempo de exploração do objeto familiar ( $p < 0.05$ ; Fig. 25 A), menor tempo de exploração do novo objeto ( $p < 0.05$ ; Fig. 25 B) e menores índices de reconhecimento de objeto ( $p < 0.05$ ; Fig. 25 C) quando comparados aos filhotes

machos provenientes de mães alimentadas com a ração normoproteica. Com relação aos filhotes fêmeas, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais analisados em nenhum dos parâmetros analisados ( $p > 0.05$ ; Fig. 25 D-F).

Figura 25- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de reconhecimento de objetos.



Nota: N= 8 animais por grupo. A) Tempo (s) de exploração do objeto familiar (machos), B) Tempo (s) de exploração do novo objeto (machos), C) Índice de Reconhecimento (machos) D) Tempo (s) de exploração do objeto familiar (fêmeas), E) Tempo (s) de exploração do novo objeto (fêmeas) e F) Índice de Reconhecimento (fêmeas). DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância:  $p * < 0.05$  comparado ao grupo controle (DN). Os dados foram submetidos ao Teste *t* de *Student* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

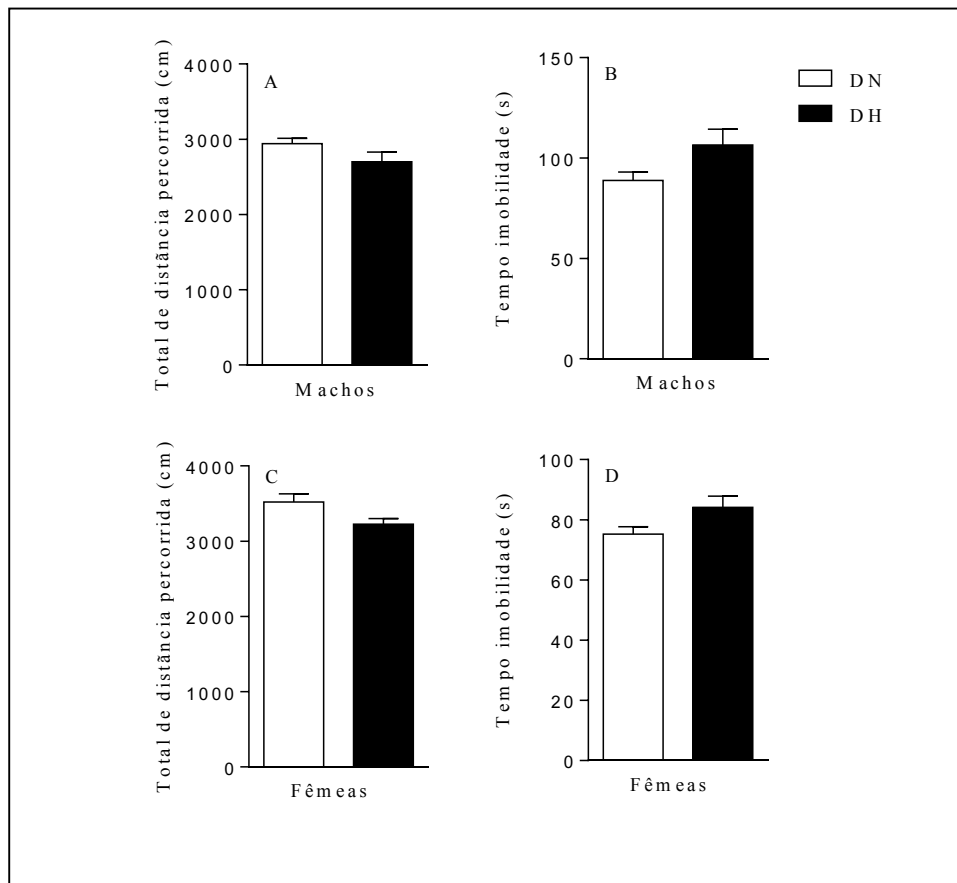
Fonte: Da autora

#### 5.4.4 Campo aberto

Os filhotes machos provenientes de mães alimentadas com a ração hipoproteica não apresentaram alterações ( $p > 0.05$ ) no total da distância percorrida (cm) e no tempo de imobilidade (s) quando comparados aos filhotes machos provenientes de mães alimentadas com

a ração normoproteica (figura 26 A e B). Da mesma forma não foram observadas alterações ( $p > 0.05$ ) no total da distância percorrida (cm) e no tempo de imobilidade (s) dos filhotes fêmeas provenientes de mães alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas aos filhotes fêmeas provenientes de mães alimentadas com a ração normoproteica (figura 26 C e D).

Figura 26- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas no teste de campo aberto.



Nota: N= 8 animais por grupo. A) Total de distância percorrida (cm), (machos), B) Tempo (s) de imobilidade (machos), C) Total de distância percorrida (cm), (fêmeas) e D) Tempo (s) de imobilidade (fêmeas). DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os dados foram submetidos ao Teste *t* de Student com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Os dados referentes a avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob o ganho de peso da ninhada durante a lactação, vocalização e performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas durante a lactação e a avaliação dos efeitos da restrição proteica materna sob a performance comportamental dos filhotes machos e fêmeas durante a adolescência foram aceitos para publicação no dia 10 de janeiro de 2018, conforme consta no **ANEXO II**.



## 5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O COMPORTAMENTO DOENTIO NOS FILHOTES MACHOS ADULTOS.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos no estudo referentes a avaliação do pré-tratamento com a dieta normoproteica ou hipoproteica nas ratas mães seguidos do tratamento com salina ou LPS nos filhotes adultos.

### 5.5.1 Campo aberto

#### -2 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica não alterou significativamente o número de cruzamentos centrais ( $p > 0.05$ , figura 27 A) quando comparados aos seus respectivos controles.

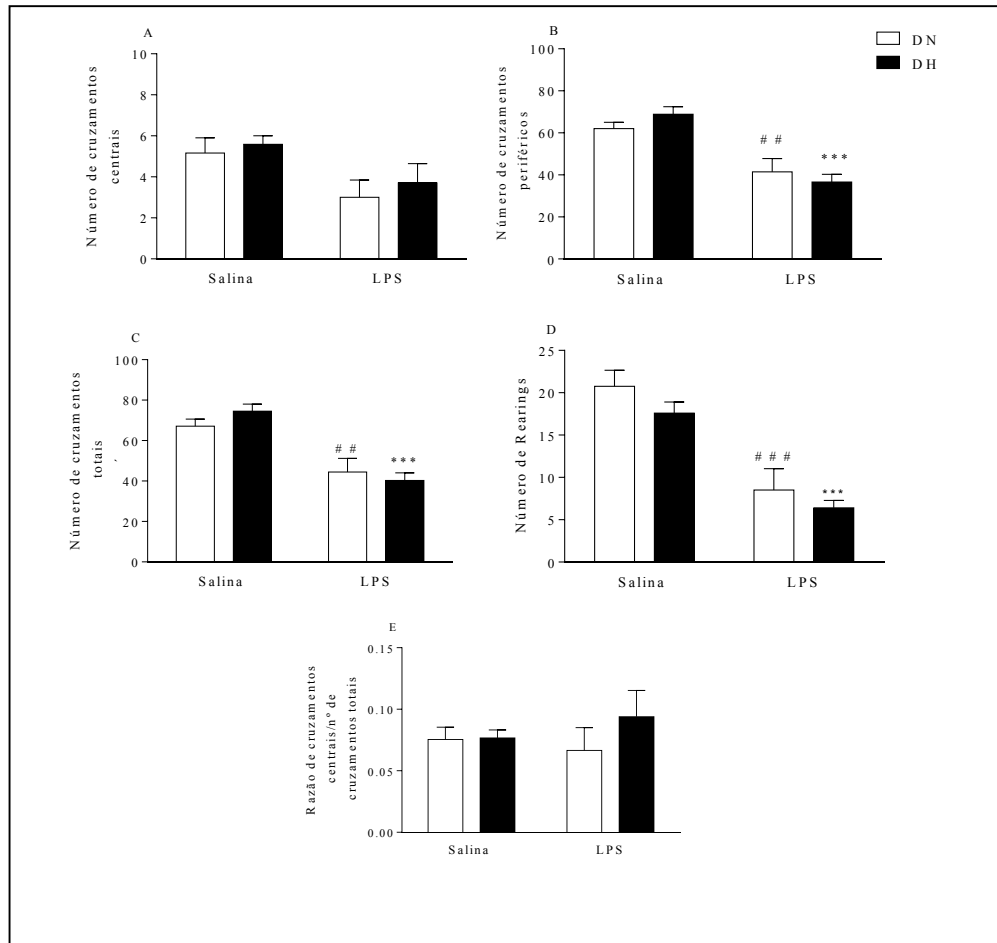
Com relação ao número de cruzamentos periféricos observou-se que o tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica provocou uma redução no número de cruzamentos periféricos ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente, figura 27 B) quando comparados aos seus respectivos controles.

O tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica provocou uma redução no número de cruzamentos totais ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente, figura 27 C) quando comparados aos seus respectivos controles.

O tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica provocou uma redução no número de *rearings* ( $p < 0.001$  e  $p < 0.001$ , figura 27 D) quando comparados aos seus respectivos controles.

Já, o tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica não alterou o número de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais ( $p > 0.05$ , figura 27 E) quando comparados aos seus respectivos controles. Em nenhum dos parâmetros analisados foram encontradas diferenças entre os grupos pré-tratados com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS ( $p > 0.05$ , figuras A-E), (análise estatística: tabela 06).

Figura 27- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de campo aberto 2 horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 10 - 12 animais por grupo. A) Número de cruzamentos centrais, B) Número de cruzamentos periféricos, C) Número de cruzamentos totais, D) Número de *rearings* e E) Razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: ##  $p < 0.01$  e ###  $p < 0.001$  quando comparado ao grupo DN+S e \*\*\*  $p < 0.001$  quando comparado ao grupo controle DH+S. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora

Tabela 06- Análise de variância de duas vias da performance comportamental dos ratos machos adultos no teste de campo aberto 2 horas após o tratamento com LPS ou salina.

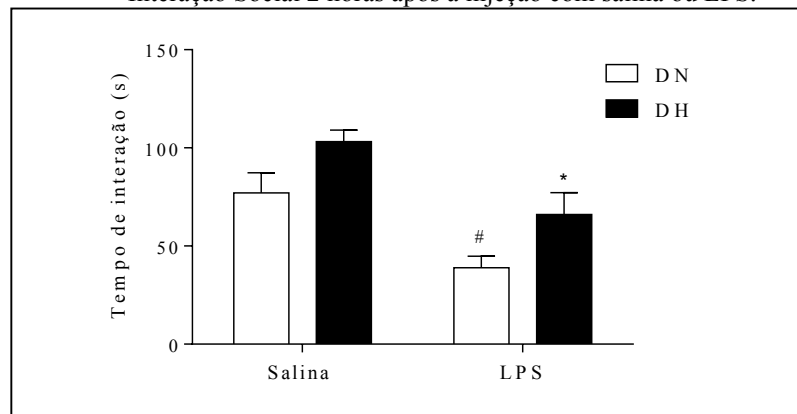
Parâmetros	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
Cruzamentos centrais	$F_{1,42} = 0.556, p > 0.05$	$F_{1,42} = 7.326, p < 0.01$	$F_{1,42} = 0.035, p > 0.05$
Cruzamentos periféricos	$F_{1,42} = 0.056, p > 0.05$	$F_{1,42} = 35.63, p < 0.001$	$F_{1,42} = 1.753, p > 0.05$
Cruzamentos totais	$F_{1,42} = 0.117, p > 0.05$	$F_{1,42} = 36.70, p < 0.001$	$F_{1,42} = 1.484, p > 0.05$
<i>Rearings</i>	$F_{1,42} = 2.051, p > 0.05$	$F_{1,42} = 40.61, p < 0.001$	$F_{1,42} = 0.084, p > 0.05$
Razão	$F_{1,42} = 0.935, p > 0.05$	$F_{1,42} = 0.079, p > 0.05$	$F_{1,42} = 0.076, p > 0.05$

### 5.5.2 Interação social

#### -2 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS tanto no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica quanto no grupo pré-tratado com hipoproteica reduziu o tempo de interação social ( $p < 0.05$ ) quando comparados aos seus respectivos controles, entretanto, não foram encontradas diferenças entre o grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS ( $p > 0.05$ ), figura 28, (análise estatística: tabela 07).

Figura 28- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de Interação Social 2 horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 9 – 10 animais por grupo. Tempo de Interação Social (*following* e *sniffing*). DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: #  $p < 0.05$ , quando comparado ao grupo DN+S. e \* $p < 0.05$  quando comparado ao grupo DH+S. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 07- Análise de variância de duas vias do tempo (s) de interação social dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com LPS ou salina.

Tempo (s) de interação social	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	$F_{1,35} = 9,177, p < 0.01$	$F_{1,35} = 18.19, p < 0.001$	$F_{1,35} = 0.003, p > 0.05$

### 5.5.3 Nado forçado

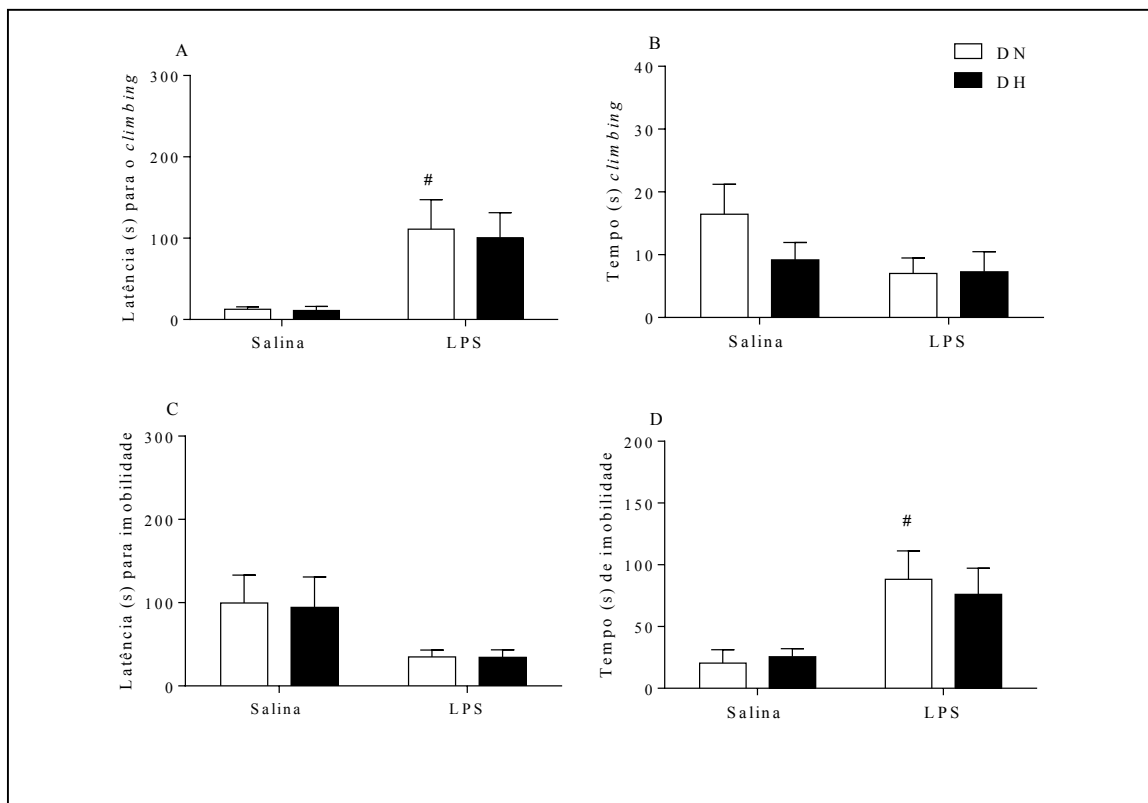
#### -2 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica aumentou a latência (s) para o climbing ( $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo DN+S, enquanto que no grupo pré-tratado com dieta hipoproteica e tratado com LPS este parâmetro não foi alterado ( $p > 0.05$ ) quando comparado ao grupo DH+S (figura 29 A).

Com relação ao tempo (s) de climbing e a latência (s) para a imobilidade, (figura 29 B e C, respectivamente), não foram observadas alterações em nenhum dos grupos analisados quando comparados aos seus respectivos controles.

Como observado na figura 29 D, o tratamento com LPS no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica aumentou o tempo (s) de imobilidade ( $p > 0.05$ ) quando comparado ao grupo DN+S, enquanto que no grupo pré-tratado com dieta hipoproteica este parâmetro não foi alterado ( $p > 0.05$ ) quando comparado ao grupo DH+S. Não foram encontradas diferenças entre o grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS em nenhum dos parâmetros analisados ( $p > 0.05$ ), (análise estatística: tabela 08).

Figura 29- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance no teste de nado forçado dos filhotes machos adultos 2 horas após a injeção com salina ou LPS



Nota: N= 10 – 11 animais por grupo). A) Latência (s) para o primeiro episódio de *climbing*, B) Tempo (s) de climbing, C) Latência (s) para o primeiro episódio de imobilidade, D) Tempo (s) de imobilidade. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: #  $p < 0.05$ , quando comparado ao grupo DN+S. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 08- Análise de variância de duas vias do nado forçado dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS.

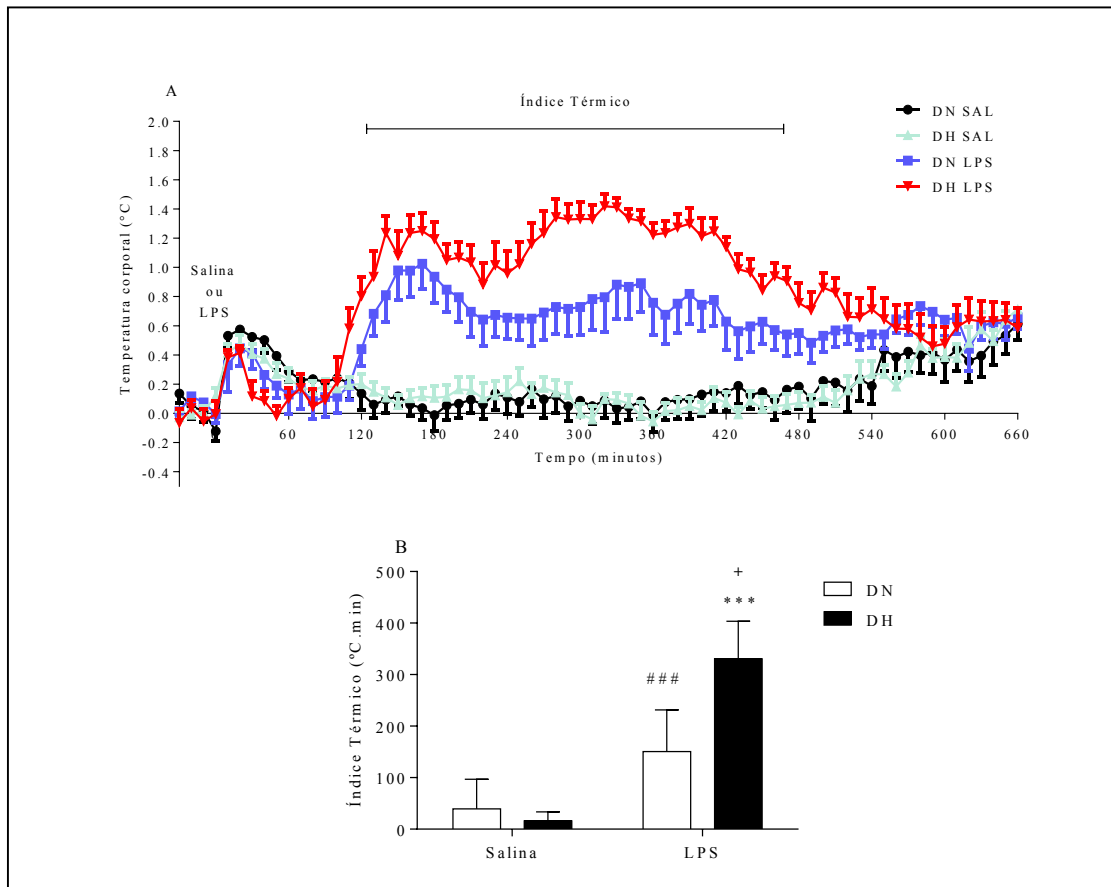
<b>Nado forçado</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
Latência (s) para o <i>climbing</i>	F <sub>1,37</sub> = 0.065, p>0.05	F <sub>1,37</sub> = 16.49, p>0.001	F <sub>1,37</sub> = 0.035, p>0.05
Tempo(s) <i>climbing</i>	F <sub>1,39</sub> = 1.023, p>0.05	F <sub>1,39</sub> = 2.697, p>0.05	F <sub>1,39</sub> = 1.189, p>0.05
Latência (s) para imobilidade	F <sub>1,39</sub> = 0.012, p>0.05	F <sub>1,39</sub> = 5.679, p<0.05	F <sub>1,39</sub> = 0.008, p>0.05
Tempo(s) imobilidade	F <sub>1,39</sub> = 0.044, p>0.05	F <sub>1,39</sub> = 12.90, p>0.001	F <sub>1,39</sub> = 0.281, p>0.05

#### 5.5.4 Telemetria

A Figura 30 A, mostra o curso temporal da temperatura corpórea depois da administração de salina ou LPS em animais provenientes de mães pré-tratadas com a dieta normoproteica ou hipoproteica.

A administração do LPS induziu a um aumento da temperatura corporal (febre) tanto no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica quanto no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica como demonstrado pela avaliação do índice térmico (área sob a curva), (figura 30 B). O índice térmico calculado de 120 minutos a 480 minutos aumentou tanto no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica quanto no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica (p <0.001), entretanto o aumento do índice térmico foi maior no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS quando comparado ao grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e tratados com LPS (figura 30 B, p < 0.05) (análise estatística: tabela 09).

Figura 30- Efeito do pré-tratamento com a dieta hipoproteica e dieta normoproteica e tratamento com salina ou LPS sob a temperatura corpórea dos ratos machos adultos.



Nota: N= 10 animais por grupo. A) Variação da temperatura corporal, B) Índice térmico do intervalo de 120 a 480 minutos após a administração de salina e LPS. Os símbolos representam o nível de significância: ###  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo DN+S e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo DH+S, +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DN+LPS. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 09- Análise de variância de duas vias do índice térmico na avaliação da temperatura corporal por telemetria dos filhotes machos adultos após o tratamento com salina ou LPS.

Índice térmico	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	$F_{1,34} = 3.377,$ $p > 0.05$	$F_{1,34} = 66.530,$ $p < 0.001$	$F_{1,34} = 4.662,$ $p < 0.05$

### 5.5.5 Campo aberto

- 6 horas após o tratamento com salina ou LPS:

Com relação ao número de cruzamentos centrais, o tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica não alterou significativamente este parâmetro quando comparado aos seus respectivos controles (figura 31 A,  $p > 0.05$ )

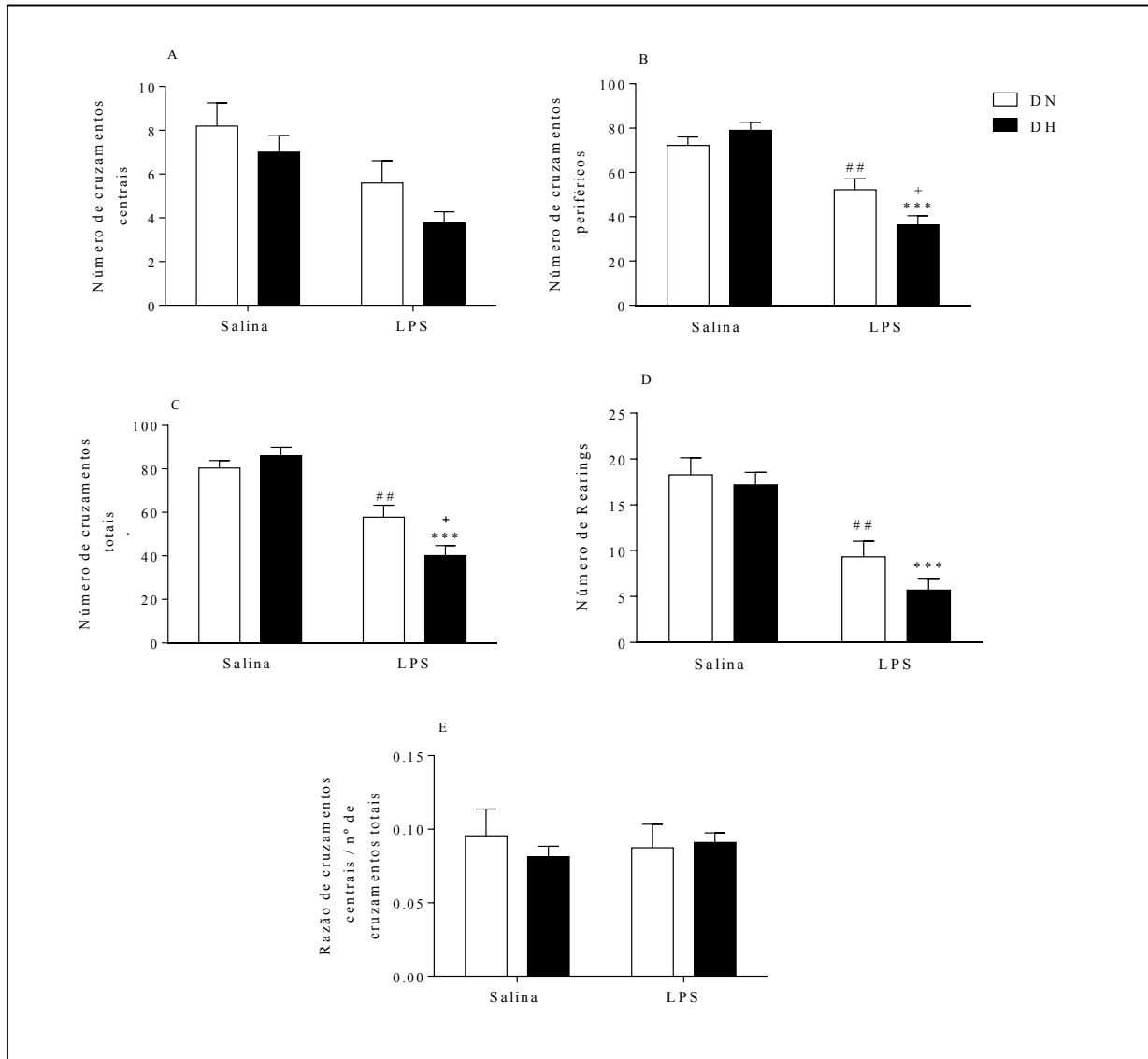
O tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica provocou uma redução no número de cruzamentos periféricos ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente, figura 31 B) quando comparados aos seus respectivos controles, entretanto esta redução foi maior no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS quando comparados ao grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e tratados com LPS ( $p < 0.05$ , figura 31 B).

O tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica provocou uma redução no número de cruzamentos totais ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente, figura 31 C) quando comparados aos seus respectivos controles, entretanto esta redução foi maior no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS quando comparados ao grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e tratados com LPS ( $p < 0.05$ , figura 31 C).

No número de *rearings*, o tratamento com LPS tanto nos grupos pré-tratados com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica provocou uma redução no número de *rearings* ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente, figura 31 D) quando comparados aos seus respectivos controles.

Já na razão do número de cruzamentos centrais/ número de cruzamentos totais não foram observadas alterações entre os grupos analisados ( $p > 0.05$ , figura 31 E) quando comparados aos seus respectivos controles, (análise estatística: tabela 10).

Figura 31- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de campo aberto 6 horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 9 – 10 animais por grupo. A) Número de cruzamentos centrais, B) Número de cruzamentos periféricos, C) Número de cruzamentos totais, D) Número de *rearings* e E) Razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: ##  $p < 0.01$ , quando comparado ao grupo DN+S e \*\*\* $p < 0.001$  quando comparado ao grupo controle DH+S, +  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo DN+LPS. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.



Tabela 10- Análise de variância de duas vias da performance comportamental dos ratos machos adultos no teste de campo aberto 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.

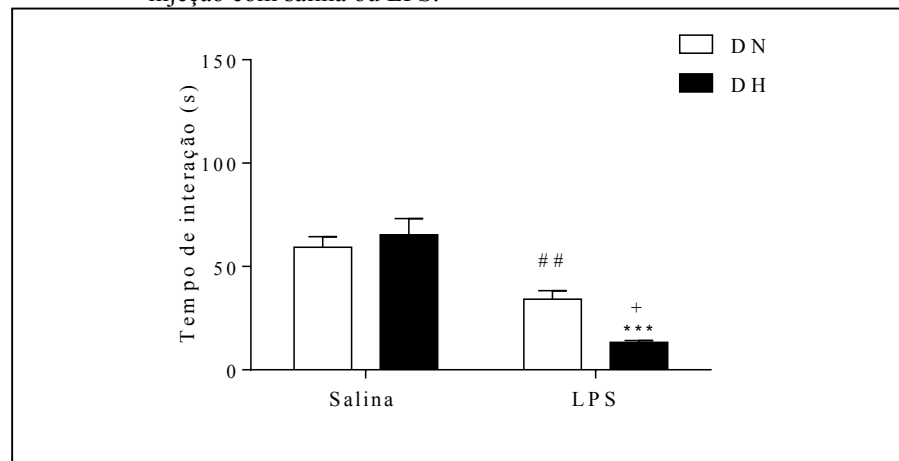
Parâmetros	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
Cruzamentos centrais	$F_{1,40} = 3.086, p > 0.05$	$F_{1,40} = 11.45, p < 0.01$	$F_{1,40} = 0.130, p > 0.05$
Cruzamentos periféricos	$F_{1,40} = 1.182, p > 0.05$	$F_{1,40} = 56.44, p < 0.001$	$F_{1,40} = 7.385, p < 0.01$
Cruzamentos totais	$F_{1,40} = 1.867, p > 0.05$	$F_{1,40} = 59.45, p < 0.001$	$F_{1,40} = 6.869, p < 0.05$
Rearings	$F_{1,40} = 2.197, p > 0.05$	$F_{1,40} = 41.06, p < 0.001$	$F_{1,40} = 0.063, p > 0.05$
Razão	$F_{1,40} = 0.164, p > 0.05$	$F_{1,40} = 0.003, p > 0.05$	$F_{1,40} = 0.472, p > 0.05$

### 5.5.6 Interação social

#### -6 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS tanto grupo pré-tratado com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica reduziu o tempo de interação social ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente) quando comparados ao seu respectivo controle, entretanto a redução do tempo de interação social foi maior no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS quando comparados ao grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e tratados com LPS ( $p < 0.05$ ), (análise estatística: tabela 11).

Figura 32- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance comportamental dos filhotes machos adultos no teste de Interação Social 6 h horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 10 animais por grupo. Tempo de Interação Social (*following* e *sniffing*). DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: ##  $p < 0.01$ , quando comparado ao grupo DN+S, \*\*\*  $p < 0.001$  quando comparado ao grupo DH+S, +  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo DN+LPS. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 11- Análise de variância de duas vias do tempo de interação dos filhotes machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.

Interação social	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	$F_{1,36} = 2.099,$ $p > 0.05$	$F_{1,36} = 56.200,$ $p < 0.001$	$F_{1,36} = 6.841,$ $p < 0.05$

### 5.5.7 Nado forçado

#### - 6 horas após o tratamento com salina ou LPS:

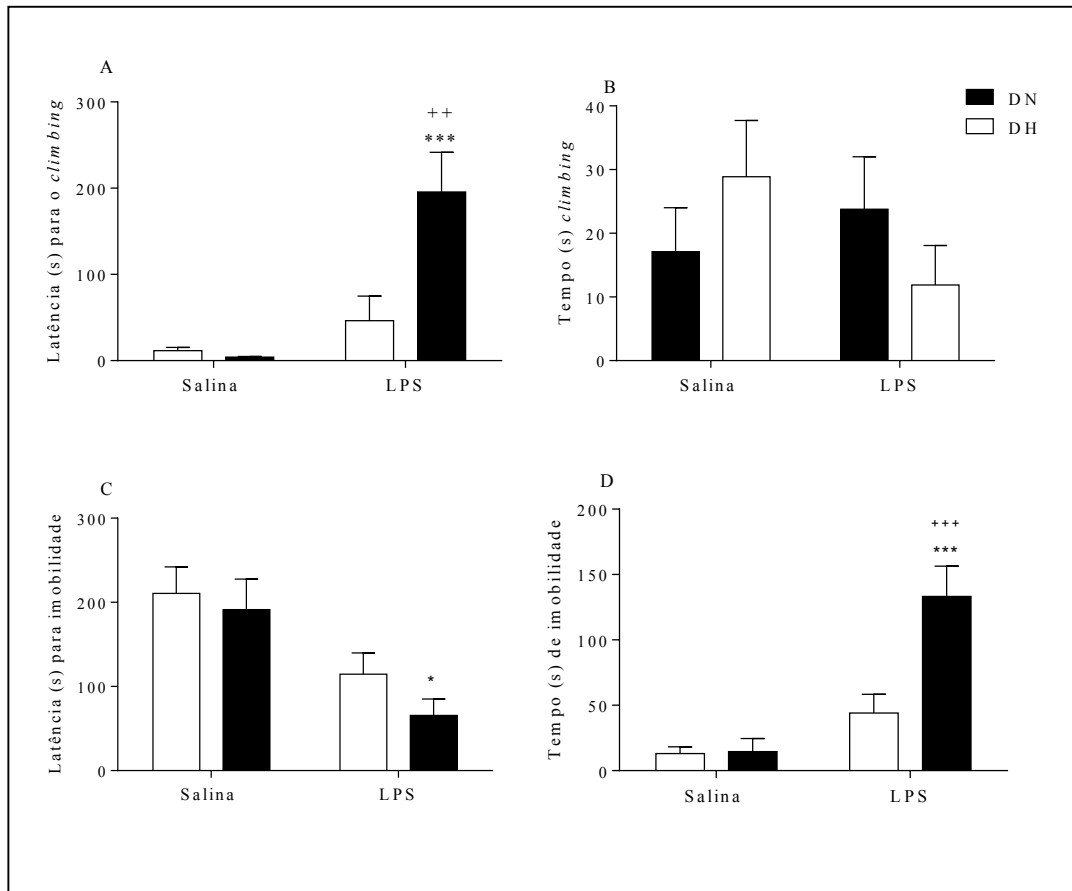
O tratamento com LPS no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica não alterou a latência (s) para o climbing ( $p > 0.05$ ) quando comparado ao grupo DN+S, enquanto que no grupo pré-tratado com dieta hipoproteica e tratado com LPS houve um aumento deste parâmetro ( $p < 0.001$ ) quando comparado ao grupo DH+S. Da mesma forma, o aumento na latência (s) para o climbing foi maior no grupo pré-tratado com dieta hipoproteica e tratado com LPS quando comparado ao grupo DN+LPS, (figura 33 A).

Com relação ao tempo (s) de *climbing* não foram observadas alterações em nenhum dos grupos analisados ( $p > 0.05$ ) quando comparados aos seus respectivos controles (figura 33 B).

Na latência (s) para a imobilidade, (figura 33 C), não foram observadas alterações ( $p > 0.05$ ) no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e tratado com LPS quando comparado ao grupo DN+S, entretanto no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS houve uma redução deste parâmetro quando comparado ao grupo DH+S. Neste parâmetro, foram observadas alterações entre os grupos tratados com LPS ( $p > 0.05$ ).

Como observado na figura 33 D, no tempo (s) de imobilidade, não foram observadas alterações ( $p > 0.05$ ) no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e tratado com LPS quando comparado ao grupo DN+S, entretanto, o grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS apresentou um aumento ( $p < 0.001$ ) deste parâmetro quando comparado ao grupo DH+S, da mesma forma houve um maior aumento ( $p < 0.001$ ) no tempo (s) de imobilidade no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS quando comparado ao grupo DN+LPS (análise estatística: tabela 12).

Figura 33- Efeitos da restrição proteica materna sobre a performance no teste de nado forçado dos filhotes machos adultos 6 horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 10 - 11 animais por grupo. A) Latência (s) para o primeiro episódio de *climbing*, B) Tempo (s) de *climbing*, C) Latência (s) para o primeiro episódio de imobilidade, D) Tempo (s) de imobilidade. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: \*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.001$ , quando comparado ao grupo DH+S, ++  $p < 0.01$  e +++  $p < 0.001$  quando comparado ao grupo DH+LPS. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 12- Análise de variância de duas vias do nado forçado dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.

Nado forçado	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
Latência (s) para o <i>climbing</i>	$F_{1,34} = 7.118, p < 0.05$	$F_{1,34} = 18.100, p > 0.001$	$F_{1,34} = 8.700, p < 0.01$
Tempo(s) <i>climbing</i>	$F_{1,34} = 6.400, p > 0.05$	$F_{1,24} = 0.455, p > 0.05$	$F_{1,34} = 2.410, p > 0.05$
Latência (s) para imobilidade	$F_{1,34} = 1.398, p > 0.05$	$F_{1,34} = 14.76, p < 0.001$	$F_{1,34} = 0.262, p > 0.05$
Tempo(s) imobilidade	$F_{1,34} = 9.910, p < 0.01$	$F_{1,34} = 27.030, p < 0.001$	$F_{1,34} = 9.241, p < 0.01$

## 5.6 DOSAGEM DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF- $\alpha$

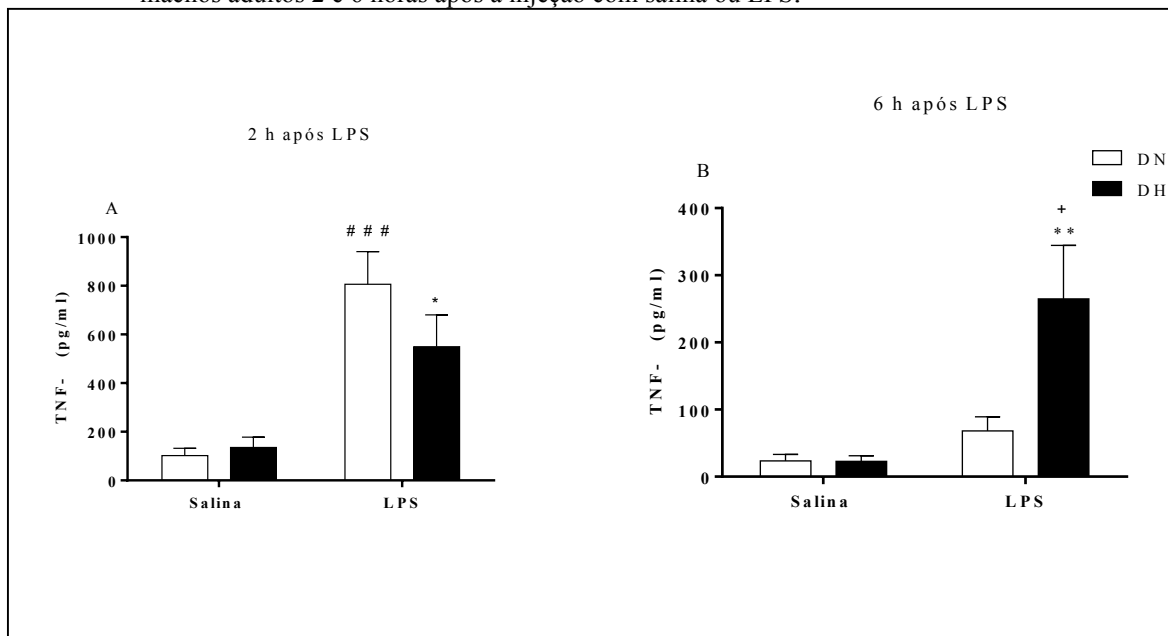
- 2 horas após o tratamento com salina ou LPS:

Como observado na figura 34 A, o tratamento com LPS tanto grupo pré-tratado com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ , respectivamente) quando comparados aos seus respectivos controles. Não foram encontradas diferenças nos níveis de TNF- $\alpha$  entre o grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS ( $p > 0.05$ ), (análise estatística: tabela 13).

- 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.

Como observado na figura 34 B, não foram observadas alterações nos níveis de TNF- $\alpha$  ( $p > 0.05$ ) no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e tratado com LPS quando comparado ao grupo DN+S, entretanto, o grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS apresentou um aumento ( $p < 0.01$ ) nos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo DH+S, além disso, observou-se um aumento acentuado desta citocina ( $p < 0.05$ ) no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS quando comparado ao grupo DN+LPS, (análise estatística: tabela 14).

Figura 34- Efeitos da restrição proteica materna sobre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  (pg/ml) nos filhotes machos adultos 2 e 6 horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 10 - 11 animais por grupo. A) Níveis de TNF- $\alpha$  2 horas após a administração de salina ou LPS. B) Níveis de TNF- $\alpha$  6 horas após a administração de salina ou LPS. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: ###  $p < 0.001$  quando comparado ao grupo DN+S; \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  quando comparado ao grupo DH+S e +  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo DH+LPS. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 13- Análise de variância de duas vias dos níveis de TNF- $\alpha$  dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS.

TNF- $\alpha$	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	F <sub>1,34</sub> = 1.438, p>0.05	F <sub>1,34</sub> = 36.08, p< 0.001	F <sub>1,34</sub> = 2.430, p>0.05

Tabela 14- Análise de variância de duas vias dos níveis de TNF- $\alpha$  dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.

TNF- $\alpha$	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	F <sub>1,31</sub> = 5.248, p<0.05	F <sub>1,31</sub> = 11.22, p< 0.01	F <sub>1,31</sub> = 5.304, p<0.05

## 5.7 DOSAGEM DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA

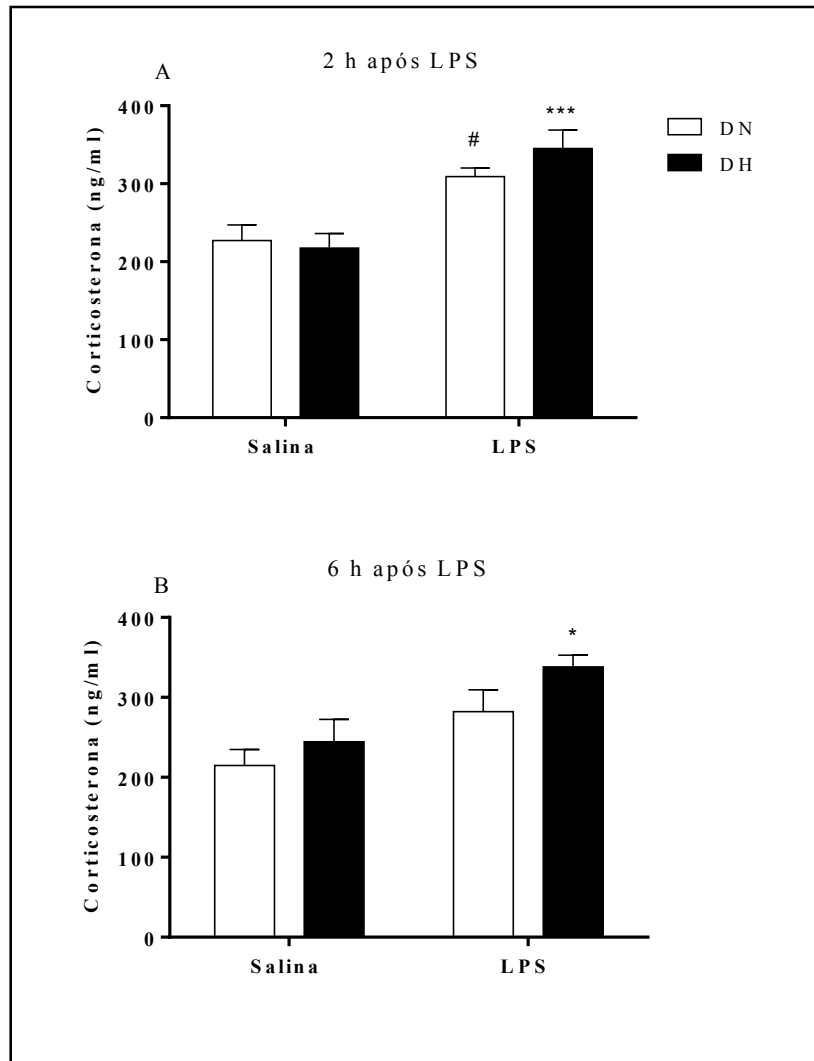
### - 2 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS tanto grupo pré-tratado com a dieta normoproteica quanto com a dieta hipoproteica aumentou os níveis de corticosterona ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , respectivamente), quando comparados aos seus respectivos controles, entretanto, não foram encontradas diferenças entre o grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS ( $p > 0.05$ ), figura 35A, (análise estatística: tabela 15).

### - 6 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica (DN+LPS) não alterou os níveis de corticosterona ( $p > 0.05$ ) quando comparado ao seu respectivo controle (DN+S), entretanto, o grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica e tratado com LPS (DH+LPS) apresentou um aumento ( $p < 0.05$ ) dos níveis de corticosterona quando comparado ao seu respectivo controle (DH+S). Não foram encontradas diferenças entre o grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS ( $p > 0.05$ ), figura 35B, (análise estatística: tabela 16).

Figura 35- Efeitos da restrição proteica materna sobre os níveis de corticosterona (ng/ml) nos filhotes machos adultos 2 e 6 horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 8 animais por grupo. A) Níveis de corticosterona 2 horas após a administração de salina ou LPS. B) Níveis de corticosterona 6 horas após a administração de salina ou LPS. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: #  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo DN+S; \*  $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.01$  quando comparado ao grupo DH+S. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 15- Análise de variância de duas vias dos níveis de corticosterona dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS.

Corticosterona	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	$F_{1,28} = 0.494,$ $p > 0.05$	$F_{1,28} = 30.69,$ $p < 0.001$	$F_{1,28} = 1.457,$ $p > 0.05$

Tabela 16- Análise de variância de duas vias dos níveis de corticosterona dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.

<b>Corticosterona</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
	F <sub>1,28</sub> = 3.418, p>0.05	F <sub>1,28</sub> = 12.04, p< 0.01	F <sub>1,28</sub> = 0.320, p>0.05

## 5.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *GFAP* POR *WESTERN BLOTTING*

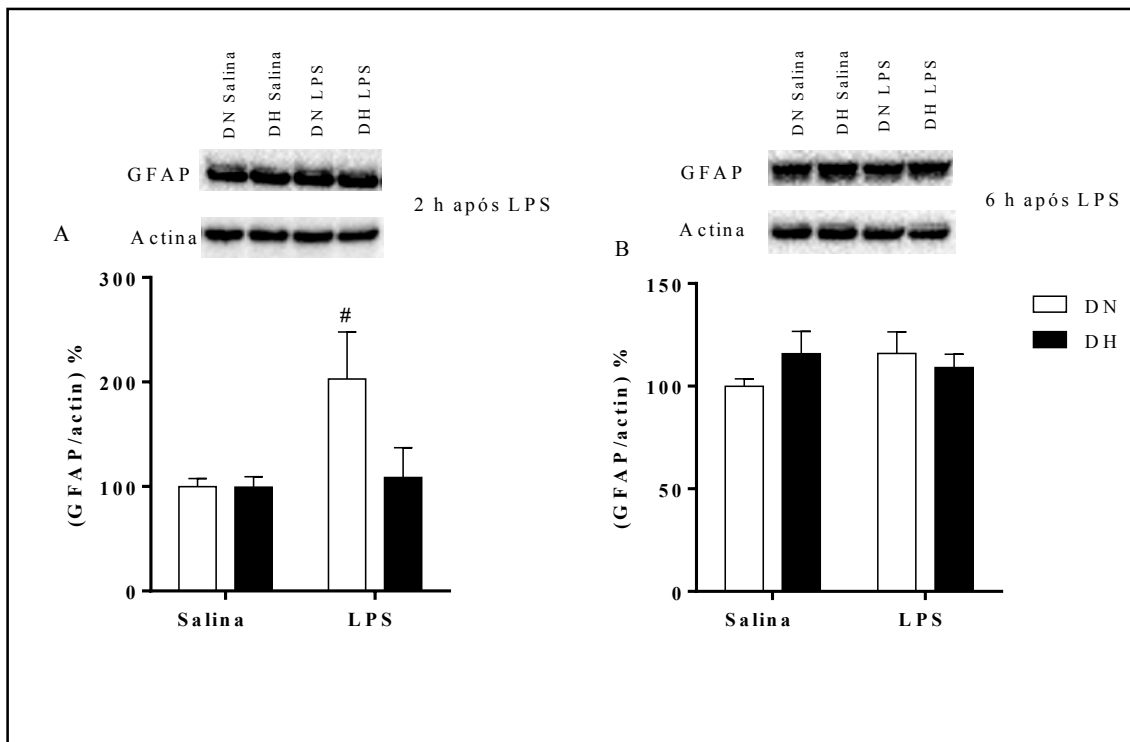
### - 2 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS no grupo pré-tratado com a dieta normoproteica aumentou a expressão de GFAP ( $p < 0.05$ ) quando comparado ao seu respectivo controle, entretanto, o pré-tratamento com a dieta hipoproteica e tratamento com LPS não alterou a expressão de GFAP ( $p > 0.05$ ) quando comparado ao seu respectivo controle. Também não foram encontradas diferenças entre o grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS ( $p > 0.05$ ), figura 36A, (análise estatística: tabela 17).

### - 6 horas após o tratamento com salina ou LPS:

O tratamento com LPS tanto grupo pré-tratado com a dieta normoproteica quanto no grupo pré-tratado com a dieta hipoproteica não alterou a expressão de GFAP ( $p > 0.05$ ) quando comparado aos seus respectivos controles. Da mesma forma não foram encontradas diferenças entre o grupo pré-tratado com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS ( $p > 0.05$ ), figura 36B, (análise estatística: tabela 18).

Figura 36- Efeitos da restrição proteica materna sobre a expressão de GFAP no hipotálamo dos filhotes machos adultos 2 e 6 horas após a injeção com salina ou LPS.



Nota: N= 4-6 animais por grupo. A) Expressão de GFAP no hipotálamo 2 horas após a administração de salina ou LPS. B) Expressão de GFAP no hipotálamo 6 horas após a administração de salina ou LPS. DN: dieta normoproteica e DH: dieta hipoproteica. Os símbolos representam o nível de significância: #  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo DN+S. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni* com valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Da autora.

Tabela 17- Análise de variância de duas vias da expressão de GFAP no hipotálamo dos ratos machos adultos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS.

(GFAP/actina)%	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	$F_{1,23} = 4.114,$ $p > 0.05$	$F_{1,23} = 5.726,$ $p < 0.05$	$F_{1,23} = 4.008,$ $p > 0.05$

Tabela 18- Análise de variância de duas vias da expressão de GFAP no hipotálamo dos ratos machos adultos 6 horas após o tratamento com salina ou LPS.

(GFAP/actina)%	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
	$F_{1,12} = 0.288,$ $p > 0.05$	$F_{1,12} = 0.297,$ $p > 0.05$	$F_{1,23} = 1.824,$ $p > 0.05$



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA NO GANHO DE PESO, INGESTÃO DE RAÇÃO E ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES E PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES

Durante o período gestacional observou-se redução do ganho de peso, nos dias 6, 9, 18 e 21 DG, das ratas alimentadas com a ração hipoproteica quando comparadas com as ratas alimentadas com a ração normoproteica. Da mesma forma, Belluscio e colaboradores (2014), observou que camundongos da linhagem CF-1 alimentados com a dieta restrita em proteínas (6% de caseína) durante a gestação e lactação apresentaram uma redução do peso corporal durante os dias 16, 17, 18 e 19 de gestação quando comparadas as mães alimentadas com a dieta normoproteica (20% de caseína), no entanto, ao nascimento observou-se um menor número de filhotes provenientes das mães alimentadas com a dieta restrita. Assim, foi sugerido que a redução do peso corporal das mães observado durante a última fase da gestação seria devido ao menor número de filhotes nascidos de mães que se alimentaram com a dieta restrita em proteínas em comparação com as mães controle.

Nos nossos resultados não foram observadas diferenças no número de filhotes nascidos das mães alimentadas com a dieta hipoproteica, entretanto, o peso das ninhadas hipoproteicas apresentou-se reduzido ao nascimento. A redução do peso corporal dos filhotes nascidos de mães alimentadas com a dieta hipoproteica também foi observada em filhotes de ratas alimentadas com a dieta restrita (5% caseína-grupo restrito, 20% caseína-grupo controle), em que, após um período de restrição proteica de duas semanas, observou-se um menor peso corporal fetal dos filhotes provenientes destas mães (GRESSENS et al., 1997). Em outro estudo, ratas *Sprague-Dawley* que foram alimentadas com a dieta restrita em proteínas (6% caseína-grupo restrito, 25% caseína-grupo controle) cinco semanas antes do acasalamento e durante todo o período de gestação deram origem a uma prole com peso inferior à prole de mães controle (TONKISS, J.; SHULTZ, P.; GALLER JR, 1994).

Assim, levando-se em consideração que o peso dos filhotes nascidos de mães alimentadas com a dieta hipoproteica pode estar reduzido ao nascimento, e considerando-se que no nosso trabalho as ninhadas apresentaram baixo peso ao nascer, sugerimos que a redução

do ganho de peso apresentada pelas ratas gestantes alimentadas com a dieta hipoproteica pode estar relacionada com a redução dos pesos dos filhotes e não a uma menor ingestão de ração consumida durante o período gestacional, já que neste período não houve diferença do consumo de ração entre os grupos analisados. Além disso, outro fator que pode contribuir para sugerir que a redução do ganho de peso gestacional é devido ao baixo peso dos filhotes é que durante a lactação o ganho de peso de ambos os grupos analisados voltaram a ser semelhantes.

Do 11º ao 20ºDL observou-se uma redução na ingestão de ração das ratas alimentadas com a dieta hipoproteica, bem como uma redução na ingestão de água durante toda a lactação. Até o momento não foram encontrados na literatura os possíveis mecanismos reponsáveis pela redução da ingestão alimentar na metade lactação. Porém, foi demonstrado que ratas alimentadas com a dieta hipoproteica durante a lactação com reduções severas na relação proteína/energia apresentam um distúrbio no comportamento alimentar com redução de aproximadamente 50% do consumo diário de ração (RAMOS et al.; 2000). Estudos ainda sugerem que essa redução da ingestão alimentar provavelmente envolva processos de saciedade no controle do comportamento alimentar em ratos (CAMBRAIA; VANNUCCHI; DE-OLIVEIRA, 1997).

A fim de avaliar possíveis alterações no comportamento materno provocadas pela restrição proteica gestacional e lactacional, neste estudo realizou-se a análise do cuidado maternal na primeira semana de lactação. As observações do cuidado materno na primeira semana de lactação, principalmente entre os dias 2 e 5 de lactação são essenciais para avaliação confiável das diferenças individuais encontradas neste comportamento, além de ser um período de maior expressão dos cuidados maternos (CHAMPAGNE et al., 2003; GROTA; ADER, 1969).

É demonstrado que a restrição proteica gestacional e/ou lactacional pode alterar o comportamento materno. Ratas *Holtzman* alimentadas com a dieta hipoproteica (12% de caseína-grupo restrito, versus 25% de caseína-grupo controle) durante a lactação apresentaram um aumento do comportamento materno, permanecendo mais tempo no ninho com seus filhotes (MASSARO; LEVITSKY; BARNES, 1974).

Além disso, estudos do nosso laboratório demonstraram a restrição proteica (6% de caseína-grupo restrito, versus 22% de caseína-grupo controle) em ratas *Wistar* durante as duas primeiras semanas de gestação aumenta o comportamento materno, com redução do tempo para recuperar os filhotes e aumento do tempo de lambida, bem como aumento do tempo em posição de cifose (BATISTA et al., 2016). Por outro lado, camundongos da linhagem CF-1 alimentados com a dieta restrita em proteínas durante a gestação e lactação (9% de caseína- grupo restrito,

versus 22% de caseína-grupo controle) apresentaram uma redução do comportamento materno, com redução no tempo gasto pelas mães lambendo os filhotes (BELLUSCIO et al., 2014).

Na literatura, ainda não existe um consenso sobre o aumento ou redução do comportamento materno de mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas, entretanto, estas contradições possivelmente estejam relacionadas a diferentes composições da dieta, linhagem de animais utilizados, período no qual ela é administrada, ou até mesmo devido a diferentes avaliações do comportamento materno. Uma vez que os efeitos da restrição proteica materna sobre o comportamento materno ainda são contraditórios e escassos na literatura, a avaliação das modificações na relação mãe-filhote em detrimento de déficits proteicos durante a gestação e lactação são importantes para contribuir no esclarecimento deste fato.

Assim, corroborando com os estudos em que foram observados um aumento no comportamento materno, nossos resultados mostraram um aumento da porcentagem dos parâmetros de lambida nos filhotes e *self-grooming* maternal.

Dentre os vários comportamentos maternos apresentados pelas ratas lactantes, o ato de lamber os filhotes é o primeiro comportamento que a mãe dirige para a sua prole. As lambidas são direcionadas principalmente para a região ano-genital dos filhotes, e uma vez que os filhotes de ratas urinam espontaneamente até depois de 2 a 3 semanas de vida pós-natal, eles dependem das lambidas para provocar o reflexo urinário e estimular a micção. Além disso, as lambidas podem favorecer a reposição de água e eletrólitos que as mães perdem durante a amamentação dos filhotes, já que estas ingerem grande parte da urina dos filhotes (FRIEDMAN; BRUNO; ALBERTS, 1981).

As lambidas ainda representam uma importante fonte de estímulos táteis para os filhotes, uma vez que podem influenciar no desenvolvimento social de machos e fêmeas (BIRKE; SADLER, 1987). Elas também podem modular o comportamento materno, uma vez que fêmeas que recebem maior quantidade de lambidas no período neonatal também passam mais tempo com seus filhotes quando se tornam mães (FRANCIS; DIORIO; LIU, 1999). Outra importante função das lambidas, é que elas também podem estar relacionadas com a modificação de circuitos neurais relacionados a redução do medo, uma vez que quando expostos a ambientes aversivos durante a idade adulta, filhotes provenientes de mães muito lambedoras tornaram-se hiporresponsivos ao medo (MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004).

Outra alteração encontrada na avaliação do comportamento materno do nosso estudo foi um aumento do parâmetro de *self-grooming* maternal, que é quando a rata lactante estimula os mamilos, possivelmente estimulando a produção de leite. Nesse sentido, estudos demonstram que a restrição proteica durante a gestação e lactação está relacionada com perda

relativa da massa das glândulas mamárias, diminuição da produção diária de leite e redução de 70% dos níveis séricos de prolactina (MORETTO et al., 2011). Diante disso, sugerimos que uma possível redução de leite disponível pelas ratas lactantes hipoproteicas possa estar relacionado ao aumento do *self-grooming* maternal encontrado no nosso estudo.

Um aspecto relevante a ser comentado é que as variações nos cuidados maternos podem afetar e influenciar a prole adulta (LIU et al.; 1997). Estudos do nosso laboratório demonstraram que a restrição proteica nas duas primeiras semanas de gestação acentuou o comportamento materno, e estes filhotes quando adultos apresentaram uma redução do comportamento tipo ansioso no teste de Labirinto em T elevado, provavelmente devido ao maior cuidado materno recebido no período pós-natal (BATISTA et al., 2016). Entretanto, no presente estudo, observamos que o aumento do comportamento materno não foi capaz de melhorar o desempenho comportamental futuro dos filhotes como será descrito posteriormente.

Além da análise do comportamento materno, a performance comportamental das ratas lactantes nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado também foi estudado.

A avaliação da atividade locomotora de roedores, bem como a redução do comportamento preditivo de ansiedade, ou efeito anti-tigmotático, podem ser avaliados no teste de campo aberto (PRUT; BELZUNG 2003; VILELA; SONCINI; GIUSTI-PAIVA, 2009).

Para a avaliação da locomoção das ratas lactantes, no nosso estudo foi analisado o número de cruzamentos totais que a rata realizou com as quatro patas nos quadrantes periféricos e centrais do aparato (WILCOXON; REDEI, 2007). Já para a avaliação do comportamento preditivo a ansiedade foram avaliados a razão do número de cruzamentos centrais sobre o número de cruzamentos totais, sendo que não observamos alterações em nenhum dos parâmetros analisados.

Com a ausência de alterações na atividade locomotora no teste de campo aberto pode-se sugerir que a restrição proteica materna não alterou a locomoção das ratas lactantes. Sugere-se ainda que possivelmente todas as alterações comportamentais expressas pelas ratas hipoproteicas, tanto nas avaliações do comportamento materno quanto no teste de labirinto em cruz elevado não estão relacionados a alterações na atividade locomotora.

Segundo Montgomery (1955), o labirinto em cruz elevado é um aparato utilizado para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade e é baseado na aversão natural dos roedores para lugares altos e espaços abertos, sendo seu uso em ratos validado em 1985 por Pellow e colaboradores.

Em nosso trabalho observou-se que as ratas lactantes alimentadas com a dieta hipoproteica apresentaram um aumento no tempo de permanência nos braços abertos e uma

redução do tempo de permanência nos braços fechados, que de acordo com Pellow e colaboradores (1985), pode ser referido como um comportamento preditivo de redução da ansiedade.

Belluscio e colaboradores (2014) observou que camundongos da linhagem CF-1 alimentados com a dieta restrita em proteínas durante a gestação e lactação apresentaram um comportamento preditivo de aumento da ansiedade quando avaliadas no teste de labirinto em cruz elevado, com redução do tempo de permanência nos braços abertos e aumento do tempo de permanência nos braços fechados, porém as vias pelas quais a restrição proteica levou ao comportamento tipo ansioso nas mães não foi esclarecido neste trabalho.

Ao contrário do estudo acima citado, em nosso trabalho, observamos que as mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas apresentaram um comportamento preditivo de redução da ansiedade. Possivelmente as contradições encontradas entre o nosso estudo e o estudo de Belluscio (2014) devem-se a diferentes composições da dieta, diferentes linhagens utilizadas, bem como ao período na qual a dieta foi administrada.

Até o momento, não foram encontrados na literatura os possíveis mecanismos responsáveis pela redução do comportamento semelhante a ansiedade nas ratas alimentadas com a dieta restrita em proteínas. Sendo assim, sugerimos que diversos fatores podem estar envolvidos nessa resposta. Por exemplo, a rata pode apresentar o comportamento semelhante a ansiedade reduzido visto que ela pode estar mais encorajada a cuidar de sua prole que demanda maiores cuidados maternos. Adaptativamente, o encorajamento das ratas hipoproteicas em cuidar da sua prole pode ser benéfico para a sobrevivência da prole, porém, ao mesmo tempo essa resposta pode ser desfavorável para a mãe. Animais expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco, que pode representar uma antecipação do perigo e é um comportamento de grande valor adaptativo (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001). Uma vez que a rata não avalia os riscos a que é exposta, como por exemplo expondo-se aos braços abertos do aparato, ela torna-se mais vulnerável aos perigos impostos pelo ambiente.

## 6.2 EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB O GANHO DE PESO DA NINHADA DURANTE A LACTAÇÃO, VOCALIZAÇÃO E PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A LACTAÇÃO

Os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram menores ganhos de peso durante a lactação o que corrobora com estudos anteriores (BATISTA et al., 2016; REYES-CASTRO et al., 2012a e 2012b). Um dos fatores que poderia ter contribuído para a redução do ganho de peso nas ninhadas hipoproteicas é que a restrição proteica durante a gestação e lactação ainda está relacionada com perda relativa da massa das glândulas mamárias, diminuição da produção diária de leite e redução de 70% dos níveis séricos de prolactina das mães (MORETTO et al., 2010). Estes fatores possivelmente acarretariam em uma ingestão de leite diminuída pelos filhotes ocasionando a perda de peso observada em nosso estudo.

O menor ganho de peso observado nas ninhadas provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica ainda pode ser em decorrência da deficiência de proteínas no período intra-uterino e neonatal. Nesse sentido, dietas deficientes em proteínas são implicadas como importantes reguladores da programação metabólica e futuros prejuízos na saúde da prole (REYES-CASTRO et al., 2012a e 2012b).

Além disso, em nossos estudos, observamos que os filhotes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação, quando separados de sua mãe e irmãos, apresentaram uma diminuição na emissão do número de vocalizações ultrassônicas (VUS) em comparação com a prole masculina e feminina do grupo normoproteico. As VUSs têm um papel comunicativo essencial na interação mãe-filhote além de servirem como um sinal afetivo dependendo da situação, e ainda são usados como meio de comunicação social (WÖHR; SCHWARTING, 2013; PASCIUTO et al., 2015). Portanto, o perfil alterado no número de VUSs exibido pelos filhotes machos e fêmeas pode indicar uma capacidade reduzida para se comunicar com a mãe, além de representar deficiência na comunicação social.

Sabe-se que a comunicação prejudicada dos filhotes com suas mães representa um sintoma típico do autismo, como pode ser confirmado pelo estudo que demonstrou que um modelo de indução do autismo induzido pela exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo (LPS), proveniente da parede celular de bactérias gram negativas, também leva a redução das VUSs nos filhotes (KIRSTEN et al., 2015). Do mesmo modo, os déficits nas VUSs dos filhotes após a separação materna também foram encontrados em outros modelos de animais autismo (SHU et al. 2005).

Outro teste realizado durante o período de lactação, no 13º dia, foi o *homing behavior*, que fornece uma medida de discriminação social e habilidade cognitiva, sensorial (olfativa) e

motora dos filhotes que são necessárias para discriminar entre o odor da maravalha limpa e o odor da maravalha da mãe (BIGNAMI, 1996; SERVADIO; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015). Além disso, a associação entre os odores maternos e a estimulação materna é crucial para o desenvolvimento do comportamento social e do reconhecimento social (TERRY; JOHANSON, 1996). Em nosso estudo, observamos que os filhotes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação são incapazes de usar pistas olfativas para discriminar entre um odor da maravalha limpa e o odor da maravalha da mãe no teste de comportamento *homing behavior*. O teste de *homing* permite uma avaliação da motivação precoce para um estímulo social muito relevante como é o estímulo da mãe, e prejuízos no desempenho comportamental neste teste tem sido associado aos déficits de interação observados em pacientes autistas no início da infância (LAVIOLA et al., 2009; SERVADIO; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015).

### 6.3 EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOB A PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DURANTE A ADOLESCÊNCIA

Além dos déficits na comunicação entre mãe-filhote e na discriminação olfativa que podem indicar déficits na comunicação social e na discriminação social desde os primeiros dias de vida, os comportamentos repetitivos também são padrões comportamentais associados aos sintomas do autismo. Neste estudo, realizamos o teste da placa com buracos para avaliar padrões repetitivos de imersão da cabeça na placa com buracos que são considerados parâmetros de comportamento estereotipado (MAKANJUOLA et al., 1977). Nossos resultados demonstraram que os filhotes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação apresentaram comportamento estereotipado no teste da placa com buracos com aumento do número de mergulhos com a cabeça (comportamento repetitivo) que são padrões comportamentais apresentados por pacientes autistas.

Pacientes autistas ainda apresentam déficits nas condições que envolvem brincadeiras sociais, e ainda apresentam dificuldades de adaptação a diversos contextos sociais, falta de desenvolvimento nas relações entre pares e dificuldades em fazer amigos (MDE-5, 2013; JORDAN, 2003; DÖLEN, 2015). Nesse sentido, a avaliação do comportamento juvenil de

brincadeira em roedores é uma ferramenta importante para a avaliação de déficits em habilidades sociais apresentadas por pacientes com a DEA. Nossos resultados mostraram que filhotes machos e fêmeas provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação apresentaram uma diminuição do comportamento juvenil de brincadeira quando comparados aos filhotes do grupo controle.

Pacientes com DEA apresentam déficits acentuados na interação social, incluindo a falta ou até mesmo comportamentos atípicos durante as brincadeiras sociais (MDE-5,2013). As brincadeiras sociais têm um papel crucial na identificação e diagnóstico do DEA (JORDAN, 2003). Crianças com autismo apresentam a incapacidade de se envolver em brincadeiras com os colegas, o que, por sua vez levam a um maior isolamento social. Uma vez que a oportunidade de se envolver em brincadeiras sociais é crucial para adquirir habilidades sociais e cognitivas adequadas, a falta do comportamento de brincadeiras sociais em crianças com DEA tem efeitos deletérios sobre o seu desenvolvimento levando a déficits duradouros nas habilidades sociais. (MELANCIA et al., 2017).

Crianças com autismo ainda apresentam padrões de comportamento ritualizados e tendem a explorar objetos já conhecidos ou repetitivos (DMS-5, 2013). Portanto, utilizamos o teste de reconhecimento de objetos para avaliar se a restrição proteica materna afetaria a tendência natural em explorar objetos novos. Normalmente, os roedores quando são expostos a um objeto familiar e a um novo objeto normalmente passam mais tempo explorando o novo objeto (ENNACEUR 2010). Em nosso estudo, observamos que os filhotes machos de mães alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação apresentaram aumento no tempo de exploração do objeto familiar, redução no tempo de exploração do objeto novo e redução do índice de reconhecimento de objetos quando comparados com os filhotes machos do grupo controle. Portanto, sugerimos que o aumento no tempo de exploração do objeto familiar, bem como a redução no tempo de exploração do novo objeto estão relacionados à insistência nas mesmas coisas e ao uso de objetos repetitivos encontrados em pacientes com autismo, como demonstrado pela persistência dos animais em explorar o objeto familiar mesmo na presença de um novo objeto.

Além disso, é importante notar que os resultados obtidos no presente estudo não foram influenciados pela perda de atividade locomotora, uma vez que não houve mudança na atividade locomotora no campo aberto entre os grupos experimentais de machos e fêmeas analisados.

Deste modo, sugere-se que a desnutrição proteica materna induz na prole comportamentos que se assemelham a alguns dos principais sintomas encontrados em pacientes



com DEA. Este é um estudo importante, já que ainda não se conhece as causas e muito menos o tratamento para DEA. Assim, conhecendo-se que a incidência do DEA está aumentando na população, é importante identificar fatores que podem predispor ao desenvolvimento de DEA, como a desnutrição proteica materna.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA NA TEMPERATURA CORPORAL E COMPORTAMENTO DOENTIO INDUZIDOS POR LPS NOS FILHOTES MACHOS ADULTOS

A fim de avaliar a influência da restrição proteica materna no comportamento doentio e temperatura corporal induzidos por LPS, no presente trabalho, baseamos a escolha da dose em estudos prévios do nosso laboratório onde a dose de 1000 µg/Kg foi capaz de induzir o comportamento doentio e resposta febril nos animais analisados (NOGUEIRA DE PAIVA, 2013; ORLANDI et al., 2015). Além disso, a escolha pela via de administração intraperitoneal (via i.p.) se deu pelo fato de que segundo Bassi e colaboradores (2012), esta pode influenciar tanto na comunicação neuroimune quanto na termorregulação, bem como induzir alterações comportamentais típicas como hipofagia, redução do comportamento social e sexual e redução da preferência a sacarose (O'REILLY; VANDER; KLUGER, 1988; YIRMYA, 1996). Além disso, a via i.p. permite a rápida entrada do LPS na corrente sanguínea (MUNFORD, 2010).

Estudos do nosso laboratório sugerem um período de latência de duas horas para que o comportamento doentio se estabeleça (ORLANDI et al., 2015; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015). Sendo assim, 2 horas após a administração de salina ou LPS os testes comportamentais de campo aberto, interação social e nado forçado foram realizados nos filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica ou com a dieta hipoproteica.

A administração do LPS é comumente utilizada em diversos estudos, pois estimula o sistema imune inato de maneira muito semelhante a uma infecção bacteriana, sendo amplamente empregado para a avaliação do comportamento doentio induzido por citocinas (BEUTLER; RIETSCHER, 2003). O comportamento doentio é o termo usado para descrever uma série de comportamentos exibidos como parte da resposta da fase aguda e se manifestam por letargia, comportamento tipo depressivo, diminuição da atividade locomotora, perda de apetite, anedonia, anorexia e redução da interação social (KELLEY et al., 2003; DANTZER; KELLEY, 2007; SONCINI et al., 2012; AUBERT, 1999). Essas alterações comportamentais

observadas no comportamento doentio, juntamente com a resposta febril e alterações neuroendócrinas representam uma estratégia organizada do organismo para o combate da infecção (DANTZER, 2001).

Todas essas respostas observadas durante o comportamento doentio são desencadeadas principalmente pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e IL-6 produzidas por macrófagos e neutrófilos ativados. Essas citocinas, como já descrito anteriormente alcançam o cérebro via neurônios aferentes primários representado pelo nervo vago ou através da produção de IL-1 pelas células fagocíticas nos órgãos circunventriculares e plexo coroide em resposta a administração de LPS ou IL-1 periférico (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

No cérebro, são produzidos intermediários moleculares em resposta ao LPS e IL-1, representados pela PGE<sub>2</sub>. A síntese de prostaglandina se inicia com a mobilização do ácido araquidônico da membrana de fosfolípidios como resultado da ação enzimática da fosfolipase A<sub>2</sub>, o ácido araquidônico é então convertido em PGE<sub>2</sub> por ação da cicloxigenase tipo 2 (COX-2) (ENGBLOM et al.,2002). A PGE<sub>2</sub> pode mediar a ativação do PVN que contém o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) levando a ativação do eixo HHA bem como levar a ativação da área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA) desencadeando a resposta febril. Já a IL-1 produzida pelas células fagocíticas nos órgãos circunventriculares e plexo coroide podem levar depressão comportamental pela ativação de estruturas límbicas através de uma via neuronal que se origina na área postrema (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Conhecendo-se que o comportamento doentio, bem como a febre são desencadeadas após o desafio imunológico, em nossos estudos, foram realizados diferentes testes comportamentais que reconhecidamente são utilizados para a avaliação do comportamento doentio em ratos, como o teste de campo aberto, interação social e nado forçado bem como a avaliação da temperatura corpórea por telemetria e dosagem de TNF- $\alpha$

O teste de campo aberto possibilita a análise do comportamento doentio em termos de locomoção. Para a avaliação da atividade locomotora do animal, toma-se como referência a atividade locomotora total (centro + periferia), bem como a avaliação dos eventos de exploração vertical ou *rearings*. Uma baixa frequência desses comportamentos indicam uma redução da locomoção e exploração (WALSH; CUMMINS, 1976). Já o tempo gasto na área central do aparato está inversamente correlacionado com o nível de propensão à ansiedade dos animais (STANFORD, 2007).

Sabe-se que roedores preferem se deslocar pela periferia do aparato quando são colocados no campo aberto, a este comportamento dá-se o nome de tigmotaxia, já o inverso, ou seja, o efeito anti-tigmotático é visto quando o animal se desloca da periferia para o centro. A avaliação do efeito anti-tigmotático, que é a relação do número de cruzamentos centrais sob o número de cruzamentos totais pode ser tomada como medida inversamente relacionada ao nível de ansiedade (ACEWICZ et al., 2014).

Nossos estudos demonstraram que filhotes adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica e hipoproteica e tratados com LPS apresentaram 2 horas depois uma redução no número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e número de *rearings*. Tomados em conjunto, a redução desses parâmetros tanto no grupo provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica quanto no grupo hipoproteico podem sugerir uma redução da atividade locomotora dos animais frente ao desafio imunológico, o que corrobora com dados da literatura que demonstram que a redução da locomoção após a administração de LPS está relacionada ao comportamento doentio (SONCINI, et al., 2012). O tratamento com LPS reduziu a locomoção nos dois grupos analisados, demonstrando assim que independentemente dos animais serem normoproteicos ou hipoproteicos, o LPS foi capaz de diminuir a locomoção da maneira semelhante.

A redução da locomoção observada em ambos os grupos administrados com LPS vão ao encontro de dados da literatura, onde a mesma dose de LPS utilizada em nosso estudo (1000 µg/Kg) em ratos *Wistar* foi capaz de provocar a redução do número de cruzamentos totais, periféricos e do número de *rearings* do grupo controle tratado com LPS quando comparado ao grupo controle tratado com salina (ORLANDI et al., 2015).

Da mesma forma, estudos demonstram que outras doses, diferentes da utilizada neste estudo, também podem induzir a redução da atividade locomotora dos animais frente ao desafio imunológico. Estudos de Swiergiel e Dunn (2007) demonstraram que a administração de LPS nas doses de 1 e 5µg/camundongo também foram eficazes em reduzir a locomoção no teste de campo aberto bem como reduzir o número de *rearings* duas horas após a administração intraperitoneal de LPS. Em outro estudo, camundongos injetados intraperitonealmente na dose de 200 µg/Kg de LPS também apresentaram redução na locomoção duas horas após a administração de LPS (KINOSHITA et al., 2009). Além disso, têm sido demonstrado que a administração periférica de IL-1β ou LPS podem reduzir o número de cruzamentos centrais bem como o número de cruzamentos periféricos (SWIERGIEL; DUNN, 2007).

As reduções na atividade locomotora induzidas por LPS supracitadas se referem a ratos ou camundongos cujas mães não foram expostas a restrição proteica materna e portanto

podem ser comparadas aos ratos normoproteicos expostos ao LPS do nosso estudo. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura como os filhotes adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas na gestação e lactação se comportam no campo aberto frente ao desafio imunológico. Porém, diante dos nossos dados, sugerimos que o LPS reduz a atividade locomotora igualmente, tanto no grupo normoproteico quanto no hipoproteico duas horas após a administração de LPS.

No que se refere ao teste de interação social, este possibilita a análise do comportamento doentio em termos de comunicação/contato entre os animais. Ele foi criado por File e Hyde em 1978 baseado no comportamento natural do animal em interagir com outro da sua espécie. As variáveis analisadas eram o tempo que o animal gastava cheirando, seguindo ou lambendo o outro no qual ele interagia.

Sabe-se que o LPS é capaz de reduzir as interações sociais entre roedores, dessa forma, a redução do tempo em que o animal gasta interagindo com o outro é tido como uma medida de comportamento doentio tanto em ratos quanto em camundongos, (ARAKAWA; BLANDINO; DEAK, 2009; FISHKIN; WINSLOW, 1997). As variáveis comportamentais analisadas no teste de interação social podem incluir o tempo em que o animal residente gasta cheirando qualquer parte do corpo do outro animal (*sniffing*), o tempo que o animal residente gasta lambendo o outro animal (*grooming*) e o tempo que o animal residente gasta seguindo o outro animal (*following*) (OVERSTREET; KNAPP; BREESE, 2002; MANDUCA et. al., 2015).

No presente trabalho, a interação social apresentou-se diminuída após duas horas do tratamento com LPS, tanto no grupo de filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica, quanto no grupo hipoproteico.

A redução da interação social corrobora com dados da literatura, onde a administração da mesma dose de LPS utilizada neste estudo (1000 µg/Kg) foi capaz de reduzir as interações sociais duas horas após o desafio imunológico com LPS (ORLANDI et al., 2015). Semelhantemente, outros estudos demonstram que o LPS, em diferentes doses, é capaz de reduzir as interações sociais.

Por exemplo, em um estudo, utilizando-se a administração intraperitoneal de LPS na dose de 0,33mg/Kg, observou-se que tanto camundongos adultos quanto idosos apresentaram redução das interações sociais quando avaliados duas horas após a administração de LPS (TOWNSEND et al., 2014). Da mesma forma, o LPS na dose de (15µg/Kg, via i.p.) também mostrou-se eficaz em reduzir o tempo gasto nas interações sociais entre camundongos (FISHKIN; WINSLOW, 1997). Igualmente ao LPS, a citocina IL-1β tem sido demonstrada

como principal mediadora da redução das interações sociais observada em roedores, uma vez que injeções intraperitoneais de antagonistas dos receptores de IL-1 (IL-1ra) foram capazes de atenuar o efeito depressivo induzido por LPS na exploração e interação social (BLUTHÉ; DANTZER; KELLEY; 1992; ARAKAWA; BLANDINO; DEAK, 2009). No que se refere aos animais provenientes de mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas, um estudo avaliou os efeitos da restrição proteica iniciada cinco semanas antes do acasalamento e mantida durante toda a gestação (25 % de caseína, grupo controle, versus 6% de caseína, grupo restrito) em ratas *Sprague-Dawley* sobre as interações sociais dos filhotes machos e fêmeas adultos. Neste estudo demonstrou-se que a desnutrição proteica pré-natal diminuiu a incidência dos comportamentos sociais dos filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta restrita quando comparados aos filhotes provenientes de mães controle, sugerindo assim que a restrição proteica pré-natal poderia influenciar nas interações sociais durante a idade adulta (ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996).

Em nosso estudo, os animais normoproteicos e hipoproteicos tratados com salina não diferiram entre si no que se refere as interações sociais, o que se contrapõe ao estudo acima citado. Sugerimos que as diferenças encontradas na avaliação das interações sociais dos filhotes machos adultos podem ser consequência de diferentes linhagens de animais utilizados, bem como tempo de administração e composição da dieta.

No estudo de Almeida, Tonkiss e Galler, (1996) descrito anteriormente, as análises são referentes aos filhotes hipoproteicos adultos que não foram expostos ao desafio imunológico. Com relação aos filhotes adultos hipoproteicos e submetidos a administração de LPS, até o momento, não foram encontrados na literatura como estes animais respondem no teste de interação social frente ao desafio imunológico. Porém, diante dos nossos dados, sugerimos que o LPS reduz as interações sociais igualmente, tanto no grupo normoproteico quanto no hipoproteico duas horas após a administração de LPS.

Quanto ao teste de nado forçado, este foi realizado para a avaliação do comportamento doentio no que se refere ao comportamento preditivo de depressão.

Após a administração do LPS, roedores submetidos ao teste de nado forçado apresentam um aumento do tempo de imobilidade, e o aumento deste parâmetro é tido como um comportamento semelhante a depressão (LI et al., 2015). Além disso, o aumento no tempo de imobilidade no teste de nado forçado pode ser relacionado a um comportamento adaptativo para a manutenção de energia, ou com a falta de motivação do animal que perde a expectativa de fuga (PRESTON, WEST, 1990). Os resultados no nosso estudo demonstraram que os filhotes provenientes de mães normoproteicas e submetidos ao desafio imunológico

apresentaram um aumento da latência para o *climbing* bem como um aumento no tempo de imobilidade duas horas após a administração de LPS.

A latência para o *climbing* é a medida do tempo decorrido entre a colocação do animal no aparato de nado e o primeiro episódio em que este realiza movimentos vigorosos com as patas dianteiras contra a parede, como uma tentativa de escape, já a imobilidade consiste na falta de movimentos de todo o corpo, onde o animal apresenta apenas pequenos movimentos necessários para que a cabeça se mantenha acima da água (BARROS; FERIGOLO, 1998).

Segundo Willner (1984), o comportamento de imobilidade estaria relacionado a desistência do animal em escapar do estímulo estressante, o que seria semelhante ao retardo psicomotor apresentado por pacientes deprimidos.

Os resultados referentes ao teste de nado forçado encontrados em nosso estudo corroboram com dados da literatura, que demonstraram que o LPS, em uma dose diferente da utilizada neste estudo, de 0.5 mg/kg, i.p., também podem induzir ao comportamento tipo depressivo, como demonstrado pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos (CUSTÓDIO, et al., 2013).

Além disso, a administração de LPS nas doses de 1 e 5 µg/kg, i.p., bem como a administração de IL-1β (100, 300 e 1000 ng / i.p.) em camundongos CD-1 demonstraram um aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, sugerindo assim que o LPS e IL-1β provocam alterações comportamentais no teste de nado forçado que se assemelham aos comportamentos preditivos de depressão (DUNN; SWIERGIEL, 2005).

Sabe-se também que antidepressivos reduzem a imobilidade no teste de nado forçado. Antidepressivos que aumentam a neurotransmissão de serotonina aumentam o comportamento de nado, enquanto que antidepressivos que aumentam a neurotransmissão catecolaminérgica aumentam o comportamento de escalada (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005).

Ao contrário dos animais provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica que apresentaram um aumento da latência para o *climbing* e aumento no tempo de imobilidade após duas horas de administração do LPS, nos animais provenientes de mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas, o LPS duas horas depois não reduziu nenhum parâmetro avaliado.

Até o momento não foram encontrados na literatura como estes animais hipoproteicos e submetidos ao desafio imunológico se comportam no teste de nado forçado duas horas após a administração de LPS. Assim, no presente estudo, sugerimos um possível atraso na resposta

comportamental no teste de nado forçado dos animais hipoproteicos e submetidos ao desafio imunológico.

Além das alterações comportamentais observadas após a administração de LPS, Hart (1988) propôs que a resposta febril representa juntamente com as alterações comportamentais uma estratégia altamente organizada do organismo para combater a infecção, uma vez que aumenta a capacidade de resposta imune contribuindo para a sobrevivência do organismo infectado.

A febre é desencadeada pelo aumento regulado da temperatura corporal que se sobrepõe as flutuações diárias normais que ocorrem em conjunto com um ponto de ajuste termorregulador (MACKOWIAK, 2005). A regulação da resposta febril depende das propriedades de substâncias chamadas de pirogênicas (exógenas e endógenas) e antipiréticas (LEON, 2002; TATRO, 2000). Os pirógenos exógenos são aqueles produzidos fora do hospedeiro e incluem parte ou produtos inteiros de microorganismos. Entre os pirógenos exógenos mais comumente utilizados para a avaliação da resposta febril está o LPS. Já os pirógenos endógenos são as chamadas citocinas pirogênicas que podem incluir a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  e são produzidas por células imunes tais como neutrófilos e macrófagos em resposta a infecção (MACKOWIAK, 2005). Ambos os pirógenos, endógenos ou exógenos são potentes indutores da resposta febril (ROTH; SOUZA, 2001)

As substâncias chamadas de criógenos podem incluir diversas substâncias, entre elas a citocina IL-10, bem como o CRH (LEON, 2002; TATRO, 2000). Essas substâncias antipiréticas podem exercer seus efeitos através da inibição da síntese de citocinas pirogênicas ou através do aumento da perda de calor (MACKOWIAK, 2005). Sabe-se que a elevação e a duração da resposta febril dependem do equilíbrio entre os pirógenos e criógenos, uma vez que a elevação dos pirógenos conduzem à febre e os criógenos se contrapõem a esta resposta impedindo a excessiva elevação da temperatura corporal (OGOINA, 2011).

Como já descrito anteriormente, a administração de LPS induz a liberação de citocinas na circulação e conseqüentemente levam ao quadro febril. As vias de sinalização pelas quais os pirógenos endógenos ou exógenos alcançam o SNC compreende uma via neural e outra humoral, ambas relacionadas a geração da febre.

A via neural se dá através dos nervos periféricos, como os nervos sensoriais cutâneos e o nervo vago, e compreende uma via de sinalização que leva a uma rápida resposta febril (ROTH; SOUZA, 2001; HOPKINS, 2007). O LPS circulante pode estimular a ativação do sistema complemento em poucos minutos. Os componentes da cascata do complemento podem ativar as células de Kupffer do fígado para produzir PGE<sub>2</sub> e pirógenos endógenos que por sua

vez ativam o ramo hepático do nervo vago. Uma vez ativado os sinais aferentes do nervo vago são levados para o núcleo do trato solitário (NTS) onde o sinal é então transmitido para POA, um importante centro termorregulador, através do feixe noradrenérgico ventral com posterior liberação de norepinefrina e elevação da temperatura corpórea. (BLATTEIS, 2007, ROTH; SOUZA, 2001).

A via humoral é conduzida pelas citocinas pirogênicas circulantes que entram no espaço perivascular através dos órgãos circumventriculares, regiões que são desprovidas de barreira hematoencefálica, como o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), e interagem com receptores localizados em terminais de células gliais levando a produção de PGE<sub>2</sub>. Além disso, os receptores na superfície das células endoteliais cerebrais podem produzir a PGE<sub>2</sub> em resposta a citocinas ou LPS circulante. A PGE<sub>2</sub> produzida então se difunde pela barreira hematoencefálica e atinge a POA provocando um aumento do *set point* termorregulatório (CONTI et al. 2004). Tanto a PGE<sub>2</sub> produzida na periferia quanto a produzida centralmente estão envolvidas na resposta febril, enquanto que a PGE<sub>2</sub> produzida na periferia pode atuar para iniciar a febre e a produzida centralmente está envolvida em sua manutenção (MACKOWIAK, 2005; OGOINA, 2011).

O PGE<sub>2</sub> é o principal desencadeador da resposta febril, entretanto sabe-se que muitos outros mediadores inflamatórios podem também provocar a febre independentemente de PGE<sub>2</sub>, como por exemplo bradicinina, CRH, óxido nítrico, IL-6 e IL-8 (ROTH; SOUZA, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que a IL-6 é uma das principais citocinas envolvidas na resposta febril uma vez que estudos com injeções intracerebroventriculares (icv) de IL-6 em ratos demonstraram uma melhor correlação desta citocina com a resposta febril (LEMAY; VANDER; KLUGER, 1990).

Na avaliação da resposta febril dos filhotes machos adultos provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica ou hipoproteica, nossos resultados demonstraram que ambos os grupos injetados com LPS apresentaram um aumento da temperatura corporal (febre). Esta resposta também foi observada por Orlandi e colaboradores (2015), quando animais controle também injetados com 1000 µg/Kg de LPS apresentaram uma resposta febril frente ao LPS. Além disso, a resposta febril pode ser observada em outros estudos utilizando-se doses menores de LPS, como por exemplo de 100 µg/Kg (HATZELMANN et al., 2013) ou 50 µg/Kg (YIRMIYA et al., 2001).

No nosso estudo, o aumento da temperatura corporal (febre) se iniciou duas horas após a administração de LPS, em ambos os grupos, normoproteicos e hipoproteicos, o que corrobora com dados da literatura que demonstram o surgimento de febre duas horas após a



administração de LPS (NAVARRO; ROCHA; BRANCO, 2007). Como evidenciado pelo aumento do índice térmico, calculado do intervalo entre 2 a 8 horas após a administração do LPS, tanto o grupo normoproteico quanto o hipoproteico apresentaram um aumento da temperatura corporal, entretanto, esse aumento foi maior no grupo hipoproteico. Observou-se também na variação da temperatura corporal que aproximadamente entre o intervalo de 4 a 7 horas a febre se manteve mais elevada no grupo hipoproteico, sendo que em 6 horas os animais provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica já estavam se recuperando do estado febril, enquanto que os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica ainda se apresentavam febris.

Diante disso, e considerando que após duas horas da administração do LPS não houve alteração comportamental entre os grupos experimentais, o próximo passo do nosso estudo foi avaliar o comportamento doentio em seis horas após a aplicação do LPS, para isto realizamos novos testes comportamentais de campo aberto, interação social e nado forçado.

Em seis horas após a administração do LPS, nossos resultados demonstraram que na avaliação do teste de campo aberto tanto os animais provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica quanto os animais provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica e tratados com LPS apresentaram uma redução do número de cruzamentos periféricos e totais bem como do número de *rearings*, entretanto observamos uma maior redução do número de cruzamentos periféricos e totais nos filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica.

Desse modo, sabendo-se que no teste de campo aberto a redução da locomoção está relacionada ao comportamento doentio como demonstrado por Orlandi e colaboradores (2015), na análise de campo aberto do nosso estudo foi evidenciado que os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica apresentaram, em termos de locomoção, um comportamento doentio mais acentuado do que os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica em seis horas após a administração do LPS.

No teste de interação social avaliado também em seis horas após a administração do LPS, observou-se redução das interações sociais em ambos os grupos analisados, porém essa redução foi maior nos filhotes provenientes de mães hipoproteicas, o que possivelmente evidencia que o comportamento doentio no que se refere as interações sociais também está mais acentuado nos filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas seis horas após a administração do LPS.

Juntos, os testes de campo aberto e interação social apontam um comportamento doentio mais acentuado nos filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica seis horas após a administração de LPS.

No teste de nado forçado seis horas após a administração do LPS, os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica não apresentaram alteração em nenhum dos parâmetros avaliados, entretanto, os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica apresentaram um aumento da latência para o *climbing* bem como um aumento do tempo de imobilidade em comparação aos animais normoproteicos e também expostos ao desafio imunológico.

Como descrito anteriormente, na segunda hora após a administração do LPS somente os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta normoproteica apresentaram um aumento na latência para o *climbing* e um aumento no tempo de imobilidade enquanto que os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica não apresentaram alterações em nenhum dos parâmetros analisados. Já na sexta hora após a administração do LPS, quando os filhotes normoproteicos já não apresentavam alteração em nenhum dos parâmetros analisados os parâmetros de latência para o *climbing* e tempo de imobilidade foram elevados somente nos filhotes hipoproteicos.

Assim analisando-se os parâmetros comportamentais no teste de nado forçado 2 e 6 horas após a administração do LPS nós sugerimos que possivelmente os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta hipoproteica apresentaram um atraso para o desenvolvimento do comportamento doentio no teste de nado forçado.

Até o momento, não foram encontrados na literatura os possíveis mecanismos responsáveis pelo atraso e maior prejuízo dos parâmetros comportamentais dos filhotes hipoproteicos e expostos ao LPS no teste de nado forçado. Ao nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro trabalho que sugere que os filhotes hipoproteicos apresentam um atraso para o desenvolvimento do comportamento doentio no teste de nado forçado.

Sabe-se que a expressão do comportamento doentio, assim como a resposta febril dependem da ação periférica de mediadores pró-inflamatórios (DANTZER et al., 2008). Assim, neste estudo realizamos a dosagem plasmática de uma importante citocina pró-inflamatória, o TNF- $\alpha$ , tanto em 2 como em 6 horas após o desafio imunológico. Nossos dados demonstraram que na segunda hora após a administração do LPS tanto os animais normoproteicos quanto os hipoproteicos apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ .

A elevação dos níveis de TNF- $\alpha$  em 2 horas após o desafio imunológico em ambos os grupos normoproteicos e hipoproteicos pode estar refletindo nas respostas comportamentais observadas nos testes de campo aberto e interação social onde o comportamento doentio em ambos os grupos normoproteicos e hipoproteico também foram semelhantes.

Na sexta hora após o desafio imunológico, quando os filhotes normoproteicos já não apresentavam alterações nos níveis de TNF- $\alpha$ , somente os filhotes hipoproteicos administrados com LPS apresentaram um aumento nos níveis desta citocina. Esta elevação de TNF- $\alpha$  pode também estar refletindo nas respostas comportamentais observadas nos testes de campo aberto e interação social em 6 horas após o desafio imunológico, onde o comportamento doentio também se mostrou ser mais acentuado no grupo hipoproteico administrado com LPS. Assim, 6 horas após o desafio imunológico, somente os animais hipoproteicos permanecem com os níveis de TNF- $\alpha$  elevados, o que demonstra uma resposta inflamatória mais persistente e prolongada neste grupo.

Bison e colaboradores (2008), trabalhando com ratos adultos *Sprague Dawley* administrados intraperitonelamente com diferentes doses de LPS (1, 5, 15, 50, 125, or 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) também observou um aumento dos níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , assim como da IL-1 $\beta$  e IL-6 em 2 horas após a administração do LPS, demonstrando dessa forma que em desafios imunológicos com LPS ocorre um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Como já mencionado anteriormente, produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  juntamente com a síntese de PGs leva ao desenvolvimento do comportamento doentio (BANKS, ERICKSON, 2010). Assim, com a avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$  podemos correlacionar as alterações comportamentais encontradas no nosso estudo com os níveis desta citocina, uma vez que é conhecido que dentre as principais citocinas envolvidas no comportamento doentio está o TNF- $\alpha$ , além da IL-1 $\beta$  (DANTZER, 2001; DANTZER, 2008). A administração periférica de LPS, assim como de IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$  mimetiza sintomas inespecíficos do Sickness, incluindo febre, ativação do eixo HHA, redução da ingestão alimentar e alterações comportamentais como redução da exploração social, diminuição da atividade locomotora e retraimento social (DANTZER; O'CONNOR; FREUND, 2008).

Com relação a corticosterona produzida durante o desafio imunológico com LPS, sabe-se que o LPS é um potente agente inflamatório e é considerado um estressor fisiológico (REYES et al., 2003). As citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  produzidas por esta endotoxina podem ativar o eixo HHA e conseqüentemente levar a um aumento dos níveis de glicocorticoides (cortisol em humanos, corticosterona em roedores), (PRUETT, 2003). A ativação do eixo HHA

se da pela ativação de neurônios parvocelulares do PVN que expressam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), assim situações de estresse agudo ou crônico podem promover a liberação do CRH no cérebro resultando em um aumento dos níveis de ACTH e glicocorticoides (CONN e FREEMAN, 2000).

Alostasia, de acordo com McEWEN, (1998) é definida como um processo de resposta fisiológica do indivíduo frente a uma situação de estresse, e é um essencial para a manutenção do equilíbrio do organismo, a adaptação a essa adversidade tem consequências para o corpo que pode ser definido como sendo carga alostática. Portanto, a carga alostática é a resposta do corpo e também do cérebro resultado da hiperatividade ou ainda da inatividade crônica dos sistemas fisiológicos envolvidos na resposta ao estresse.

As respostas alostáticas mais comuns envolvem o sistema nervoso simpático (SNS) e o eixo HHA. A ativação do SNS representa uma resposta rápida ao estresse com liberação de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea. Já a resposta a longo prazo é representada pela ativação do eixo HHA resultando na liberação de glicocorticoides pelo córtex da adrenal (LEE; KIM; CHOI, 2015).

Durante situações de estresse, no caso do nosso estudo representado por um estresse imunológico provocado pelo LPS, o nível de corticosterona pode sofrer elevação do seu *set point*, e é essa diferença entre o *set point* novo e antigo que pode ser entendido como uma carga cumulativa de adaptação ao estresse, ou seja, carga alostática (LEE; KIM; CHOI, 2015).

Os nossos resultados demonstraram que em 2 horas após a administração do LPS houve um aumento dos níveis de corticosterona plasmática tanto no grupo normoproteico quanto no grupo hipoproteico. Diante do que foi exposto, observamos que os níveis elevados de corticosterona durante situações de estresse podem ser um sinal de carga alostática indicando que não houve o retorno deste hormônio aos níveis homeostáticos.

Em 6 horas após a administração do LPS, enquanto os normoproteicos já não apresentavam mais alterações nos níveis de corticosterona, somente os animais hipoproteicos administrados com LPS apresentaram uma elevação da corticosterona plasmática. Esses dados demonstram que os níveis deste mediador do estresse ainda se mantiveram elevados nos animais hipoproteicos, o que sinaliza a manutenção da carga alostática.

Até o momento ainda não são conhecidos os mecanismos de manutenção da carga alostática em roedores provenientes de mães hipoproteicas e expostos ao LPS, entretanto, McEwen (1998), propôs que a manutenção da ativação do sistema alostático pode prolongar a exposição do indivíduo aos efeitos dos mediadores alostaticos, que no caso do nosso estudo, este mediador se refere a corticosterona.

Acerca da análise da expressão da *GFAP* no hipotálamo, nossos resultados demonstraram que em 2 horas após o desafio imunológico apenas os filhotes normoproteicos apresentaram uma elevação da expressão desta proteína, já em 6 horas não foram observadas alterações no nível de expressão de *GFAP* em nenhum dos grupos analisados. Sabe-se que a ativação dos astrócitos pelo LPS é um dos principais eventos na iniciação e progressão da neuroinflamação pois, uma vez ativados aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e iNOS (LU, et al., 2010).

Estudos tem demonstrado que uma única injeção de 4µg/Kg de LPS no estriado de camundongos C57BL/6 pode levar a um aumento da expressão de *GFAP* após 24 horas, indicando assim, um estado elevado de ativação de astrócitos em resposta ao LPS (BRAHMACHARI; FUNG; PAHAN, 2006). Além disso, em ratos machos *wistar* foi observado um aumento da expressão de *GFAP* no córtex, hipocampo e mesencéfalo após a administração intraperitoneal de LPS (10mg/ kg) indicando que a inflamação periférica também leva a ativação de células gliais (SEMMLER et al., 2005).

Assim, sabe-se que uma das consequências comportamentais observadas após a ativação tanto de micróglia quanto de astrócitos é o desenvolvimento do comportamento doentio (DANTZER et al., 2008). Deste modo esperávamos que os filhotes hipoproteicos apresentassem uma elevação da expressão de *GFAP* no hipotálamo em 6 horas após o desafio imunológico, uma vez que o comportamento doentio também se mostrou mais acentuado no grupo hipoproteico administrado com LPS.

Embora não tenhamos encontrado diferença no nível de expressão proteica de GFAP em 6 horas após o desafio imunológico, não podemos concluir uma falta de reatividade astrocitária, uma vez que podem existir diferenças em níveis morfológicos dos astrócitos ativados (LIDDELOW; BARRES, 2017). Sendo assim em 6 horas, pode estar ocorrendo ativação dos astrócitos, porém, o nível de expressão de GFAP nestas células podem não ser visíveis o suficiente para serem detectadas pelo método de *Western Blotting*.

Diante da análise dos nossos resultados, mais estudos são necessários para investigar os fatores responsáveis pelo comportamento doentio prolongado nos filhotes hipoproteicos após o desafio imunológico com LPS.

## **7 CONCLUSÃO**

A restrição proteica materna induz na prole adolescente comportamentos que se assemelham as principais características associadas ao DEA e induz um comportamento doentio prolongado nos filhotes machos adultos.

## REFERÊNCIAS

ACEWICZ, A. et al. Anxiety- and depressive-like traits in Warsaw alcohol high-preferring (WHP) and Warsaw alcohol low-preferring (WLP) rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.122, p. 261-265, 2014.

ARAKAWA, H.; BLANDINO, P. J. R.; DEAK, T. Central infusion of interleukin-1 receptor antagonist blocks the reduction in social behavior produced by prior stressor exposure. **Physiol Behav**, v. 98, n. 1-2, p. 139-146, 2009.

ANDERSON, M. J. et al. Effects of ontogeny on performance of rats in a novel object-recognition task. **Psychol. Rep**, v. 94, n. 2, p. 437-443, 2004.

AUBERT, A. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 7, p. 1029-1036, 1999.

ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. **Physiol Behav**, v. 60, n. 1, p. 197-201, 1996.

ABEL, E. L.; BILITZKE, P. J. A possible alarm substance in the forced swimming test. **Physiol Behav**, v. 48, n. 2, p. 233-239, 1990.

BATISTA, T. H. et al. Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring. **Nutr Neurosci**, v. 20, n. 8, p. 437-442, 2016.

BASSI, G. S. et al. Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour evaluated in different models of anxiety and innate fear in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 110, n. 4, 359-369, 2012.

BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **J Neurosci**, v. 21, n. 17, p. 6480-6491, 2001.

BARKHUDARYAN, N.; DUNN, A. J. Molecular mechanisms of actions of interleukin-6 on the brain, with special reference to serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Neurochem Res**, v. 24, n. 9, p. 1169-1180, 1999.

BARKER, D. J. Intrauterine programming of adult disease. **Mol Med Today**, v. 1, n. 9, p. 418-423, 1995.

BARROS, H. M.; FERIGOLO, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. **Neurosci Biobehav Ver**, v. 23, n. 2, p. 279-286, 1998.

BARKER, D. J. The fetal origins of type 2 diabetes mellitus. **Ann Intern Med**, v. 130, p. 322-324, 1999.

BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE, M. O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. **Rev Neurocienc**, v. 20, n. 1, p. 117-127, 2012.

BERARDI, A. et al. An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Front Behav Neurosci**, v.8, n.142, 2014.

BELLUSCIO, L. M. et al. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. **Physiol Behav**, v. 129, p. 237-254, 2014.

BEUTLER, B.; RIETSCHER, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n.2, p. 169-176, 2003.

BERCZI I. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. **Annals of the New York Academic of Science**, v. 840, p. 787-802, 1998.

BIGNAMI, G. Economical test methods for developmental neurobehavioral toxicity. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 2, p. 285-298, 1996.

BISON, S. et al. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. **Int J Interferon Cytokine Mediator Res**, v. 1, p.1-13, 2009.

BIRKE, L. I.; SADLER, D. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. **Dev Psychobiol**, v. 20, n.1, p. 85-99, 1987.

BLATTEIS, C. M. The onset of fever: new insights into its mechanism. **Prog Brain Res**, v. 162, p. 3-14, 2007.



BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav**, v. 25, n. 3, p. 205-218, 2001.

BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Res**, v. 537, n. 2, p. 318-320, 1992.

BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y. K.; PAHAN, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. **J Neurosci**, v. 26, n. 18, p. 4930-4939, 2006.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 36, p. 178-196, 2015.

BROWN, A. S & SUSSER, E. S. *Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia*. **Schizophr. Bull**, v. 34, n. 6, p.1054-1063, 2008.

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A. The expectant brain: adapting for motherhood. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 11-25, 2008.

CARPENTIER, P. A.; DUNCAN, D. S.; MILLER, S. D. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 2, p. 140-147, 2007.

CARPENTIER, P. A. et al. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. **Glia**, v. 49, n. 3, p. 360-374, 2005.

CAMPBELL, D. G. et al. Prevalence of depression-PTSD comorbidity: implications for clinical practice guidelines and primary care-based interventions. **J Gen Intern Med**, v. 22, n. 6, p. 711-718, 2007.

CAMBRAIA, R. P. B.; VANNUCCHI, H.; DE-OLIVEIRA, L. M. Food intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 8, p. 985-988, 1997.

CALDJI, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, n. 9, p. 5335-5340, 1998.

CECÍLIA, C. M. et al. Gestational protein restriction induces a reduced number of glomeruli in the Young. **Nutrition Research**, v. 22, p. 497-1505, 2002.

CONTI, B. et al. Cytokines and fever. **Front Biosci**, v. 1, n. 9, p. 1433-1449, 2004.

CONN, P. M.; FREEMAN, M. E. **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. New Jersey: Humana Press, 2000.

CUSTÓDIO, C. S. et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 713, n. 1-3, p. 31-38, 2013.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, n. 6, p. 1119-1128, 2005.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiol Behav**, v. 79, n. 3, p.359-371, 2003.

CHAMPAGNE, F.; MEANEY, M. J. Like mother, like daughter: Evidence for nongenomic transmission of parental behaviour and stress responsivity. **Prog Brain Res**, v. 133, p. 287-302, 2001.

CLAIR, D. et al. Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. **Jama**, v. 294, n. 5, p. 557-562, 2005.

CLEMENT, J. G.; MILLS, P.; BROCKWAY, B. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. **J Pharmacol Methods**, v.21, n. 2, p. 129-140, 1989.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, 547-569, 2005.

CRUNFLI, F.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 3, p. 246-255, 2014.

DAWSON, G. et al. Neural correlates of face and object recognition in young children with autism spectrum disorder, developmental delay, and typical development. **Child. Dev**, v. 73, n.3, p. 700–717, 2002.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 2, p. 153-160, 2007.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Ver Neurosci**, v.9, n. 1, p. 46-56, 2008.

DANTZER R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol**, v.500, n.1-3, p. 399-411, 2004.

DANTZER R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain Behav Immun**, v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001.

DANTZER R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Ann N Y Acad Sci**, v. 933, p.222-234, 2001.

DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.840, p. 586-590, 1998.

DER-AVAKIAN, A.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic exposure to amphetamine, but not nicotine, leads to an immediate and enduring deficit in motivated behavior without affecting social interaction in rats. **Behav Pharmacol**, v. 21, n. 4, p. 359–368, 2014.

DÖLEN, G.; Autism: Oxytocin, serotonin, and social reward. **Soc. Neurosci**, v. 10, n. 5, p. 450-465, 2015.

DUMORTIER, O. et al. A restrição protéica materna leva a insuficiência pancreática na prole: papel de misexpressed microRNA-375. **Diabetes**, v. 63, n.10, p. 3416-3427, 2014.

DURAN FERNANDEZ-FEIJOO, C. et al. Influence of catch up growth on spatial learning and memory in a mouse model of intrauterine growth restriction. **PLoS One**, v. 12, n. 5, 2017.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 81, n. 3, p. 688-693, 2005.

EREN KOÇAK, E.; KILIÇ, C. Cognitive Dysfunctions in Posttraumatic StressDisorde. **Turk Psikiyatri Derg**, v.28, n.2, p. 124-131, 2017.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues, **Behav. Brain Res**, v. 215, n. 2, p. 244-254, 2010.

ENGBLOM, D. et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. **J Mol Med**, v. 80, n. 1, p. 5-15, 2002.

EK, M. et al. Distribution of the EP3 prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 1, p. 5-20, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of Food Security and Nutrition in the World. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-I7695e.pdf>>. Acesso em: dec 2017.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends Immunol**, v. 28, n. 3, p. 138-145, 2007.

FARIA, T. S. et al. Maternal malnutrition during lactation affects folliculogenesis, gonadotropins, and leptin receptors in adult rats. **Nutrition**, v.26, n. 10, p. 1000-1007, 2009.

FEOLI, A. M. et al. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. **Brain Res**, v.1187, p. 33-41, 2007.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? **Br J Pharmac**, v. 62, p. 19-24, 1978.

FISHKIN, R. J.; WINSLOW, J. T. Endotoxin-induced reduction of social investigation by mice: interaction with amphetamine and anti-inflammatory drugs. **Psychopharmacology**, v. 132, n. 4, p. 335-41, 1997.

FOMBONNE, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. **Pediatric Research**, v. 65, n. 6, p. 591-598, 2009.

FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LIU, D. Nongenomic transmission across generations in maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1155-1158, 1999.

FRIEDMAN, M. I.; BRUNO, J. P.; ALBERTS, J. R. Physiological and behavioral consequences in rats of water recycling during lactation. **J Comp Physiol Psychol**, v. 95, n. 1, p. 26-35, 1981.

GOMES, P. B. et al. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 2, p. 209-214, 2008.

GRESSENS, P. et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. **Brain Research Dev Brain Res**, v. 103, n. 1, p. 21-35, 1997.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**, v. 17, n. 4, p. 722-729, 1969.

HAVA, G. et al. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental Psychobiology**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HABBOU, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 5, p. 553-562, 2013.

HATZELMANN, T. et al. Antipyretic effect of central [Pyr1] apelin 13 on LPS-induced fever in the rat. **Regul Pept**, v. 184, p. 6-13, 2013.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Ver**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HERNANDES, A. S. et al. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. **Behavioral Brain Research**, v. 162, n. 2, p. 240-245, 2005.

HOPKINS, S. J. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural hormonal collaboration. **Acta Biomed**, v. 78, p. 1231-1241, 2007.

INGRAM, J.L. et al. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. **Neurotoxicol Teratol**, v. 22, n. 3, p. 319-324, 2000.

JOCA, S. R.; GUIMARÃES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology**, v. 185, n.3, p. 298-305, 2006.

JORDAN, R. Social play and autistic spectrum disorders: a perspective on theory, implications and educational approaches. **Autism**, v. 7, n. 4, p. 347-360, 2003.

KALYNCHUK, L. E. et al. Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 6, p. 1365-1377, 2004

KAFFMAN, A.; MEANEY, M. J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 48, n. 3, p. 224-244, 2007.

KARATSOREOS, I. N.; McEWEN, B. S. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. **Trends Cogn Sci**, v. 15, n. 12, p. 576-584, 2011.

KELLEY, K.W. et al. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun**, v. 17, p. 112-118, 2003.

KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KEANE, T. M. et al. Posttraumatic Stress Disorder. In: Hersen M., Ammerman R.T. Handbook of Prescriptive Treatments for Adults. **Springer**, 1994.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sci**, v. 130, p. 12-17, 2015.

KINOSHITA, D. et al. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. **Physiology & Behavior**, v. 96, n. 2, p. 328-332, 2009.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 3, p. 154-159, 2002.

KOCH, L. et al. Inhibition of LPS Induced Activation of Coagulation by p38 MAPK Inhibitor. **Hematol**, 2012.

LAVIOLA, G. et al. Gene-environment interaction during early development in the heterozygous reeler mouse: clues for modelling of major neurobehavioral syndromes. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 4, p.560-572, 2009.

LAZIC, S.E.; ESSIUX, L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. **BMC Neurosci**, v. 22, p. 14-37, 2013.

LAW, C.M. et al. Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age. **Circulation**, v. 105, n.9, p. 1088-1092, 2002.

LEE, D. Y.; KIM, E.; CHOI, M. H. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. **BMB Rep**, v. 48, n. 4, p. 209-216, 2015.

LEON, L. R. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **J Appl Physiol**, v. 92, n. 6, p. 2648-2655, 2002.

LEMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **Am J Physiol**, v. 258, p. 798-803, 1990.

LIBBEY, J. E. et al. Autistic disorder and viral infections. **J Neurovirol**, v. 11, n.1, p. 1-10, 2005.

LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic **Potential**. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 957-967, 2017.

LI, R. et al. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neurosci Lett**, v. 594, p.17-22, 2015.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659-1662, 1997.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50, 1991.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **J Nutr**, v.128, suppl.2, p. 401S-406S, 1998.

LU, X. et al. Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. **J Neuroinflammation**, v. 17, n. 7, 2010.

MACKOWIAK, P. A. Temperature regulation and pathogenesis of fever. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practise of infectious disease. **Elsevier Churchill Livingstone**, p. 703-718, 2005.

MANDUCA, A. et al. Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at different developmental ages in rats. **European Neuropsychopharmacology**, n. 25, v. 8, p. 1362-1374, 2015.

MAKANJUOLA, R.O. et al. An automated method for studying exploratory and stereotyped behaviour in rats, **Psychopharmacology**, v. 52, n. 3, p. 271-277, 1977.

MASSARO, T. F.; LEVITSKY, D. A.; BARNES. R. H. Protein malnutrition in the rat: its effects on maternal behavior and pup development. **Dev Psicobiol**, v. 7, n. 6, p. 551-561, 1974.

MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE DESORDENS MENTAIS (MDE-5). Washington: American Psychiatric Association, 2013.

MEYER, U.; YEE, B. K.; FELDON, J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? **Neuroscientist**, v. 13, n. 3, p. 241-256, 2007.

MENARD, J. L.; CHAMPAGNE, D. L.; MEANEY, M. J. Variations of maternal care differentially influence 'fear' reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 297-308, 2004.

MELANCIA, F. et al. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. **Behav Brain Res**, n. 321, p. 113-122, 2017.

MELANCIA, F.; TREZZA, V. Modelling fragile X syndrome in the laboratory setting: A behavioral perspective. **Behav Brain Res**, v. 17, p. 149-163, 2018.

MOTA, C. M. D. et al. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. **Brain Behav Immun**, v. 66, p. 373-381, 2017.



MORETTO, V. L. et al. Low-Protein Diet during Lactation and Maternal Metabolism in Rats. **ISRN Obstet Gynecol**, v. 2011, p. 1-7, 2010.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.

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

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.

McEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **N Engl J Med**, v. 338, n. 3, p. 171-179, 1998.

MUNFORD, R. S. Murine responses to endotoxin: another dirty little secret? **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 2, p. 175-177, 2010.

NAVARRO, V. P.; ROCHA, M. J. A.; BRANCO, L. G. S. Reduced central c-fos expression and febrile response to repeated LPS injection into periodontal tissue of rats. **Brain Research**, v. 1152, p. 57-63, 2007.

NESTERENKO, T. H.; ALY, H. Fetal and neonatal programming: evidence and clinical implications. **Am J Perinatol**, v. 26, n. 3, p. 191-198, 2009.

NORDEN, D. M. et al. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia**, v. 64, n. 2, p. 300-316, 2016

NOGUEIRA DE PAIVA, V. **Influência do sistema endocanabinóidesobre o sickness behavior induzido pela endotoxemia em ratos**. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

NOLDUS, L. P. J. J.; SPINK, A. J.; TEGELBOSCH, R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 33, n. 3, p. 398-414, 2001.

NUMAN, M.; INSEL R. T. **The neurobiology of parental behavior**. New York: Springer, 2003.

OGOINA, D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'a review. **J Infect Public Health**, v. 4, n. 3, 108-124, 2011.

OVERSTREET, D. H.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. **Alcohol Clin Exp Res**, v.26, p. 1259–1268, 2002.

OKA, T. et al. Relationship of EP (1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 1, p. 20-32, 2000.

ORLANDI, L. et al. Sickness behavior is accentuated in rats with metabolic disorders induced by a fructose diet. **J Neuroimmunol**, v. 15, n. 289, p. 75-78, 2015.

O'REILLY, B., VANDER, A. J., KLUGER, M. J. Effects of chronic infusion of lipopolysaccharide on food intake and body temperature of the rat. **Physiology & Behavior**, v. 42, p. 287-291, 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience**. Disponível em: <[http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal\\_perinatal\\_health/anc-positive-pregnancy-experience/en/](http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal_perinatal_health/anc-positive-pregnancy-experience/en/)>. Acesso em: 2 Dec. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Gender and women's mental health**, (2017). Disponível em: <[http://www.who.int/mental\\_health/prevention/genderwomen/en/](http://www.who.int/mental_health/prevention/genderwomen/en/)>. Acesso em: 2 Dec. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Fact Sheet on Autism Spectrum Disorders**, (2017). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheet/autismo-spectrum-disorders/en/>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, n. 1, p. 15-19, 2004.

PATHAK, R. M. et al. Intestinal brush border membrane structure and function: effect of early postnatal undernutrition. **Pediatr Res**, v. 15, n. 2, p. 112-114, 1981.

PAINTER, R. C.; ROSEBOOM, T. J.; BLEKER, O. P. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. **Reprod Toxicol**, v.20, n. 3, p. 345-352, 2005.

PASCIUTO, E. et al. Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior, *Neurobiol. Learn. Mem*, v. 124, p. 71-78, 2015.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PRESTON; WEST, A. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. **Prog Neuro-Psychopharm Biol Psych**, v.14, p. 863-877, 1990.

PRUETT, S. B. Stress and the immune system. **Pathophysiology**, v. 9, n. 3, p.133-153, 2003

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

PRYCE, C. R. et al. Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 1, p. 71-83, 2001.

QASEM, R. J.; CHERALA, G.; D'MELLO, A. P. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation in rats imprints long-term reduction in hepatic lipid content selectively in the male offspring. **Nutr Res**, v. 30, n. 6, p. 410-407, 2010.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635- 700, 2002.

RAMOS, C.F. et al. Thyroid function in post-weaning rats, which dams were fed a low protein diet during suckling. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v.30, n.1, p.133-137, 1997.

REGER, M. L.; HOVDA, D. A.; GIZA, C. C. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. **Dev Psychobiol**, v. 51, n. 8, p. 672-678, 2009.

RECH, R. L. et al. Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. **Exp. Gerontol**, v. 45, n. 5, p. 351-356, 2010.

REYES, T. M. et al. Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **J Neurosci**, v. 23, n. 13, p. 5607-5616, 2003.

REYES-CASTRO, L. A. et al. Hippocampal mechanisms in impaired spatial learning and memory in male offspring of rats fed a low-protein isocaloric diet in pregnancy and/or lactation. **Hippocampus**, v. 28, n. 1, p. 18-30, 2017.

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

REYES-CASTRO, L. A. et al. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. **Behav. Brain Res**, v. 227, n. 2, p. 324-329, 2012b.

RIVEST, S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n.8, p. 761-788, 2001.

RODNIGHT, R. et al. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 3, p. 325-338, 1997.

ROSEBOOM, T. J. et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Twin Res**, v.4, n.5, p. 293-298, 2001.

ROSSO, P.; CRAMOY, C. **Nutrition and pregnancy**. Nutrition: Human Nutrition (A Comprehensive Treatise, 1979).

ROTH, J.; SOUZA, G. E. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 3, p. 301-314, 2001.

STAM, R. PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 2: animal models. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 31, n.4, p. 558-584, 2007.

STANFORD, S. C. The Open Field Test: reinventing the wheel. **J Psychopharmacol**, v. 21, n. 2, p. 134-145, 2007.

SCATTONI, M.L. et al. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **PLoS One**, v.3, n. 8, 2008.

SALUK-JUSZCZAK, J.; WACHOWICZ, B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. **Postepy Biochemi**, v. 51, n. 3, p. 280-287, 2005.

SEMMLER, A. et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **J Chem Neuroanat**, v. 30, n. 2, p.144-157, 2005.

SERVADIO, M.; VANDERSCHUREN, L. J.; TREZZA, V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist? **Behav. Pharmacol**, v. 26, n.6, p. 522-540, 2015.

SERVADIO, M. et al. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid, *Transl. Psychiatry*, v. 6, n.9, 2016.

SILVA, V. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. **Brain Behav and Imm**, v. 45, p. 109-117, 2015.

SONCINI, R. et al. Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neurosci Lett**, v. 516, n. 1, p. 114-118, 2012.

SHU, W. et al. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene, *Proc. Natl Acad Sci*, v. 102, n. 27, p. 9643-9648, 2005.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. Effects of Interleukin-1 $\beta$  and Lipopolysaccharide on Behavior of Mice in the Elevated Plus-Maze and Open Field Tests. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 86, n. 4, p. 651-659, 2007.

TATRO, J. B. Endogenous antipyretics. **Clin Infect Dis**, v. 5, p. 190-201, 2000.

TERRY, L. M.; JOHANSON, I. B. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. **Dev. Psychobiol**, v. 29, n. 4, p. 353-377, 1996.

TOWNSEND, B.E. et al. Dietary broccoli mildly improves neuroinflammation in aged mice but does not reduce lipopolysaccharide-induced sickness behavior. **Nutr Res**, v. 34, n.11, p. 990-999, 2014.

TORDJMAN, S. et al. Gene × Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. **Front Psychiatry**, v. 5, n. 53, 2014.

TONKISS, J.; SHULTZ, P.; GALLER, J. R. An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. **Physiol Behav**, v. 55, n. 2, p. 217-224, 1994.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L. J. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v.197, n. 2, p. 217-227, 2008.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J.; VANDERSCHUREN, L. J. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 12, p. 2560-2573, 2009.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J.; VANDERSCHUREN, L. J. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v.31, n. 10, p. 463-469, 2010.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open- field behavior of rats. **Am J Psychol**, v. 83, n. 1, p. 103-111, 1970.

VERONESI, V. B. **Influência da dipirona sódica sobre as respostas comportamentais em camundongos fêmeas lactantes e a repercussão nos filhotes adolescentes**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Saúde), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

VILELA, F. C.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 124, n. 2, p. 325-327, 2009.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behav Brain Res**, v. 263, p. 190-197, 2014.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci**, v.6, n.8, p.626-40, 2005.

WALSH, R. N. CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WILGENFELD, K. et al. Effect of current and lifetime posttraumatic stress disorder on 24-hour urinary catecholamines and cortisol: results from the mind your heart study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 83-91, 2016.

WILCOXON, J. S.; REDEI, E. E. Maternal glucocorticoid deficit affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and behavior of rat offspring. **Horm Behav**, v. 51, n. 3, p. 321-327, 2007.

WILLIAMSON, C. S. Nutrition in pregnancy. **Nutrition Bulletin**, v. 31, p. 28-59, 2006.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p.1-6, 1984.

WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res**, v. 354, n.1, p. 81-97, 2013.

YIRMYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research**, v. 711, p. 163-174, 1996.

YIRMIYA, R. et al. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 531-544, 2001.

YOUNG, C. M.; LEE, P. C.; LEBENTHAL, E. Maternal dietary restriction during pregnancy and lactation: effect on digestive organ development in suckling rats. **Am J Clin Nutr**, v. 46, n. 1, p. 36-40, 1987.

ZHANG, J.; RIVEST, S. Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection? **News Physiol Sci**, v. 18, p. 137-142, 2003.

ZAMBERLETTI, E.; GABAGLIO, M.; PAROLARO, D. The Endocannabinoid System and Autism Spectrum Disorders: Insights from Animal Models. **Int J Mol Sci**, v. 18, n.9, 2017.

## ANEXO I – APROVAÇÃO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 799 - Alfenas/MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1069

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



### CERTIFICADO

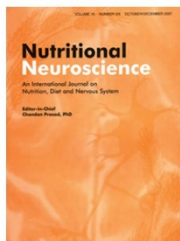
Certificamos que o Protocolo nº 635/2015, sob responsabilidade de Fabiana Cardoso Vilela Giusti, referente ao projeto "Influência da desnutrição proteica durante a gestação e lactação nas respostas comportamentais e neuroendócrinas de ratas lactantes: repercussão nos filhotes machos após estresse imunológico", está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNIFAL).

Alfenas, 08 de junho de 2015.

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira  
Presidente CEUA/UNIFAL



## ANEXO II – ARTIGO

**Nutritional Neuroscience**

An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System

ISSN: 1028-415X (Print) 1476-8305 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ynns20>

## Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring

Tatiane Helena Batista, Alexandre Giusti-Paiva &amp; Fabiana Cardoso Vilela

To cite this article: Tatiane Helena Batista, Alexandre Giusti-Paiva & Fabiana Cardoso Vilela (2018): Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring, *Nutritional Neuroscience*, DOI: [10.1080/1028415X.2018.1427660](https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1427660)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1427660>



Published online: 28 Jan 2018.

Submit your article to this journal [↗](#)View related articles [↗](#)View Crossmark data [↗](#)



# Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring

Tatiane Helena Batista<sup>1</sup>, Alexandre Giusti-Paiva<sup>1,2</sup>, Fabiana Cardoso Vilela<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), Alfenas, Brazil, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), Alfenas, Brazil

**Objective:** We tested the correlation between maternal protein malnutrition and autistic-like symptoms using behavioral tests in rodents that measure main behavioral characteristics observed in humans with autism spectrum disorder (ASD).

**Methods:** Pregnant female rats were fed a normal diet or a hypoproteic diet during gestation and lactation periods. The litters were weighed every 3 days during lactation, and the offspring were tested in behavioral tasks during infancy (postnatal day (PND) 5: quantification of ultrasonic vocalizations; PND 13: homing behavior test) and adolescence (PND 30–32: open field, hole-board, play social behavior, and object recognition tests) in order to capture the prevalence of some of the core and associated symptoms of ASD.

**Results:** Litters of the hypoproteic diet group had a lesser weight gain during lactation. In addition, pups of dams fed with a hypoproteic diet vocalized less compared to those fed with a normal diet, and they showed impaired social discrimination abilities in the homing behavior test. In adolescence, both male and female offspring of the hypoproteic diet group showed no impairment in locomotor activity; however, they exhibited stereotypic behavior in the hole-board test and a decrease in social play behaviors. Male offspring showed increased interest in exploring a familiar object rather than a novel object.

**Conclusion:** Our results show that maternal protein malnutrition in rats causes offspring behaviors that resemble core and associated ASD symptoms.

**Keywords:** Autism spectrum disorder, Hypoproteic diet, Behavior

## Introduction

During development, there are critical periods of vulnerability to suboptimal conditions. Fetal and neonatal exposure to various maternal challenges, such as maternal malnutrition, alter offspring phenotype resulting in a developmental programming.<sup>1</sup> A low-protein maternal diet during pregnancy and lactation can induce irreversible neuroanatomical changes in offspring such as delays in astrogenesis, abnormal neuronal differentiation,<sup>2</sup> and cerebral astrogliosis in the cortex and hippocampus.<sup>3</sup> Neuroanatomical changes can contribute to the development of psychiatric disorders leading to disturbances in emotional behavior expression,<sup>4</sup> in development of cognitive function,<sup>5</sup> and in learning and memory.<sup>1</sup> These behavioral alterations characterize the symptoms of various psychiatric disorders that have been increasingly regarded as developmental disorders.

Among the least understood psychiatric disorders is autism spectrum disorder (ASD). ASD is one of the greatest challenges around the world, because it is a psychiatric disorder with severe behavioral consequences and no specific treatment available.<sup>6</sup> ASD has a multifactorial etiology being caused by a complex interplay of genetic and environmental factors. Behaviors relevant to the core and associated symptoms of ASD can be easily and effectively assessed in laboratory animals, and several rodent models are available that show specific autism-relevant behavioral features, whose neural underpinnings resemble those found in autistic patients.<sup>7,8</sup>

Knowing that maternal protein malnutrition can lead to the development of psychiatric disorders in descendants, that the prevalence of ASD has increased continuously, and that the causes of and proper treatments for ASD are not presently known, we tested the relationship between maternal protein malnutrition and the onset of ASD in the offspring. For this, we tested rodents that exhibited behavioral characteristics resembling some of the core behavioral features associated with ASD.<sup>9,10</sup> Since ASD patients typically show

Correspondence to: Fabiana Cardoso Vilela, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Avenida Jovino Fernandes Sales n° 2600, MG 37130-000, Brazil. Email: facvilela@gmail.com

poor communication skills, difficulty in social interaction,<sup>11</sup> deficits in social play,<sup>12</sup> and recognition tasks impairment,<sup>13</sup> we tested offspring born from dams fed with a hypoproteic diet (6% of casein) and those born from dams fed with a normal diet (22% of casein). The offspring underwent the following behavioral tests: (1) the pup isolation-induced ultrasonic vocalization (USV) test provides quantitative measures of USVs, which are emitted by rodent pups when they are isolated from the nest and play an essential communicative role in mother–offspring interaction;<sup>8,14</sup> (2) the homing behavior test, which provides an early measure of social discrimination, since it allows us to detect the cognitive, sensory, and motor abilities necessary to discriminate between a neutral odor and their own nest odor;<sup>8,15</sup> (3) the hole-board test at adolescence, which evaluates repetitive patterns that are considered to be parameters of stereotyped behavior;<sup>16</sup> (4) the social play interaction test at adolescence, which enables the detection of social behaviors both related and unrelated to play;<sup>8,17</sup> and (5) the object recognition test, which evaluates the pups' insistence on the sameness and their repetitive exploration of familiar objects.<sup>10</sup>

## Materials and methods

### Animals

Adult Wistar nulliparous female and male rats at 9 weeks of age were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas and were housed in a temperature-controlled room (22°C) on a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with ad libitum access to water and standard laboratory rat chow until the beginning of the experiments. The female rats were time-mated by being placed with sexually experienced male rats (two females for one male). The next morning, vaginal lavage was performed, and the day that sperm was observed during vaginal lavage was designated as gestation day 1 (GD1). The parturition day was considered to be post-natal day 1 (PND 1). All experimental procedures followed the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Alfenas (protocol 635/2015). The experiments were performed in accordance with good laboratory practice protocols and quality assurance methods.

### Maternal feeding

For all procedures, we used 16 pregnant female rats that were divided into two experimental groups ( $n = 8$  per group): normal diet (22% of casein) or hypoproteic diet (6% of casein). The dams were kept in individual cages (42 × 34 × 16 cm) and were fed a normal diet or a hypoproteic diet from GD1 until the day of weaning of the offspring (PND 22), that is during all gestation and lactation periods. After weaning, the

pups were fed standard laboratory rat chow (normal diet, 22% of casein). Both the normal and hypoproteic diets are isocaloric (3.046 kcal/kg) being that the difference in the formulation besides the percentage of proteins is the percentage of cornstarch (normal diet: 17.45% of cornstarch; hypoproteic diet: 30.26% of cornstarch). The diets were obtained from PRAGSOLUÇÕES Biosciences, Jaú-SP, Brazil.

### Experimental design

At PND 2, all litters were culled to 8 pups (four males and four females) and the litters ( $n = 8$  per group) were weighed every 3 days until PND 20. The litters (32 female rats and 32 male rats from each experimental group) were used for the experimental procedures. One couple (one male and one female rat) from each litter was randomly selected for analysis of USV at PND 5 ( $n = 8$  per group), and another couple (one male and one female rat) from each litter was used for the homing behavior test on PND 13. After weaning, the animals were kept four to a cage and separated by sex until they reached adolescence (PND 30–32). To avoid the litter effect, one couple (one male and one female rat) from each litter received an ink mark on one hind limb with different colors and each couple was used only once for each test to evaluate behavioral performance through the open field, hole-board, social play, and object recognition tests.<sup>18</sup>

### Litter body weight

The weight of each litter ( $n = 8$  litters per group) was recorded every 3 days during lactation from PND 2 until PND 20.

### Ultrasonic vocalizations

On PND 5, one male pup and one female pup from each litter were assessed for USV monitoring. One at a time, each pup was separated from its littermates, and placed in a temperature-controlled (30°C) box for 10 minutes. Then, the pup was placed in a shallow beaker, which served as a soundproof chamber, below a microphone connected to a computerized acquisition system (ML 221 PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) to detect USVs at 40–100 kHz. Sounds were recorded for 4 minutes, and the total number of USV was subsequently analyzed.<sup>19</sup> The shallow beaker was carefully cleaned with a 5% ethanol solution after every test.

### Homing Behavior

On PND 13, one male and one female pup from each litter were separated from the dam and kept for 30 minutes in a temperature-controlled room (25°C). Then, each pup was placed into a Plexiglas box whose floor was covered with 1/4 bedding from the pup's home cage (nest bedding) and 3/4 clean bedding. The pup was located at the side of the box

covered with clean bedding, and its behavior was analyzed for 4 minutes in real time by an observer. The following parameters were recorded: the latency in seconds to reach the nest bedding area, the total time in seconds spent by the pup in the nest bedding area, and the total number of entries into the nest bedding area.<sup>10</sup>

#### Locomotor activity evaluation in an open field

Locomotor activity was recorded in an open field box of acrylic separated into squares (60 cm × 60 cm × 60 cm). The center was defined as four squares, and eight squares along the walls were considered the periphery. In PND 30–32, each rat was gently placed in the exact center of the box and filmed for 5 minutes. This recording was used for subsequent behavioral analysis using the program *EThoVision XT 9.0*, a computerized observation system that is capable of performing the tracking, analysis, and behavioral recognition by means of videos.<sup>20</sup> We analyzed the total distance traveled in centimeters and the time of immobility in seconds. The arena was carefully cleaned with a 5% ethanol solution after each test.

#### Hole-board test

The hole-board apparatus consisted of a square arena (40 cm × 40 cm) with a black background and 16 holes, each with a 3-cm diameter. In PND 30–32, the rats were individually placed in the apparatus and their behavior was filmed for 5 minutes; the recording was used for subsequent behavioral analysis. The parameter measured through filming was the number of head dips, which was defined by the animal dipping its head to the medial third of the ear, covering the eyes with the holes of the plaque.<sup>9</sup> The arena was carefully cleaned with a 5% ethanol solution after each test.

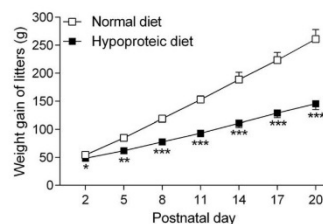
#### Social play behavior

The testing arena consisted of a Plexiglas cage measuring 60 cm × 60 cm × 60 cm. Rats were individually

habituated to the test cage for 10 minutes on each of the 3 days before testing. On the day of the test (PND 30–32), the animals were isolated for 3.5 hours before testing to enhance their social motivation and thus facilitate the expression of social play behavior during testing.<sup>21,22</sup> Two animals belonging to the same experimental group were placed into the test cage for 10 minutes, and the play behavior interactions were then recorded for further analysis. The parameters analyzed were (1) time in seconds spent on social exploration, defined as sniffing any part of the body of the test partner, including the anogenital area, and (2) time in seconds of following, defined as running forward in the direction of or pursuing the other subject, who moved away. With the objective of reducing interferences in behavioral response, the animals in a pair did not differ more than 10 g in body weight and had no previous social experience.<sup>10</sup>

#### Object recognition test

The object recognition test evaluates a rodent's ability to recognize a previously explored object in the presence of a new object not known over time.<sup>23</sup> Two days before the test, the animals were exposed to the test box for 10 minutes for habituation purposes, in order to ensure that the animals would spend a sufficient amount of time exploring the objects.<sup>24</sup> The test was performed in PND 30–32 in a square arena (40 cm × 40 cm) with a floor covered in sawdust. The animals were presented with two identical objects (A and B) for 10 minutes (training period). At 2 hours later, the rat was returned to the cage, where one of the training objects A or B (familiar object) was replaced by a new object C (novel object). All objects presented similar textures and sizes, but distinctive shapes. The rats were individually placed in the arena, and their behavior was filmed for 10 minutes for subsequent analysis. Exploration was defined by sniffing or touching the object with the nose. The time spent exploring each of the two objects (familiar or novel object) was taken as a measure of object exploration. A recognition index (RI) was calculated for each animal and was expressed by the ratio:  $RI = TN / (TF + TN)$ , where TF is the time spent exploring the familiar object (object A or B) and TN is the time spent exploring the novel object (object C).<sup>10,24,25</sup> Between trials, the objects and the arena were cleaned with 5% ethanol solution.



**Figure 1** Effects of maternal protein malnutrition on the weight gain of litters in grams (g) during lactation. The data represent the mean ( $\pm$ SEM) of eight litters per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  when compared to the normal diet group. The data were analyzed by a two-way repeated-measures ANOVA followed by the Bonferroni test.

#### Statistical analysis

The data were plotted using the GraphPad software program (version 6.0) and are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were made using two-way repeated-measures ANOVA, followed by the Bonferroni test or the

Student's *t*-test. A *P* value of less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) was used to establish statistical significance.

## Results

### Litter body weight

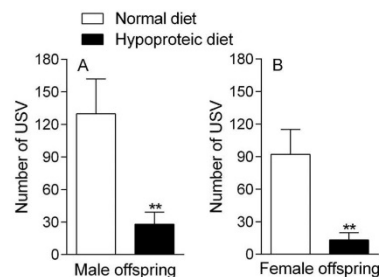
The analysis of weight gain of the offspring during lactation (Fig. 1) showed that there was a reduction in weight gain for the litters of dams fed with a hypoproteic diet between PND 2 ( $P < 0.05$ ) and PND 20 ( $P < 0.001$ ) when compared to litters of the normal diet group (diet factor:  $F_{(1,98)} = 172.3$ ,  $P < 0.001$ ; day factor:  $F_{(6,98)} = 83.87$ ,  $P < 0.001$ ; interaction:  $F_{(6,98)} = 10.70$ ,  $P < 0.001$ ).

### Ultrasonic vocalizations

The analysis of the number of USV showed that male offspring (Fig. 2A) and female offspring (Fig. 2B) of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation presented a decreased number of USV ( $P < 0.01$ ) when compared to offspring of the normal diet group.

### Homing behavior

Fig. 3 shows the performance of male and female offspring in the homing behavior test. The male offspring of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation presented an increase in the latency to reach the nest bedding ( $P < 0.05$ ; Fig. 3A) and a decrease in time spent in the nest area ( $P < 0.001$ ; Fig. 3B) when compared to the male offspring of the normal diet group. No differences between groups were found in the total number of entries into the nest bedding area ( $P > 0.05$ ; Fig. 3C). For female offspring, there was an increase in the latency to reach the nest bedding ( $P < 0.05$ ; Fig. 3D), a decrease in time spent in the nest area ( $P < 0.05$ ; Fig. 3E), and a decrease in the total number of entries into the nest bedding area ( $P < 0.01$ ; Fig. 3F) in the offspring of



**Figure 2** The effects of maternal protein malnutrition on the isolation-induced USV emitted by the male (A) and female (B) offspring on PND 5. Each column represents the mean ( $\pm$ SEM) of eight animals per group. \*\* $P < 0.01$  when compared to the offspring of the normal diet group. Data analyzed by Student's *t*-test.

the hypoproteic diet group when compared to those of the normal diet group.

### Locomotor activity evaluation in an open field

Fig. 4 shows the performance of an exploratory activity for the male and female offspring of dams who were or were not fed a hypoproteic diet. According to our data, there was no difference between the experimental groups in the total distance traveled or in time of immobility in both male offspring ( $P > 0.05$ ; Fig. 4A and B) and female offspring ( $P > 0.05$ ; Fig. 4C and D), respectively.

### Hole-board test

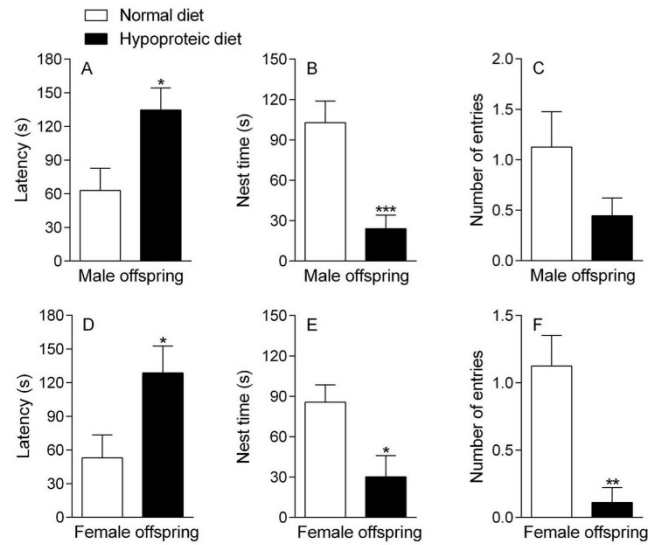
Fig. 5 shows the number of head dips in the hole-board test for male and female offspring. Male offspring of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation showed stereotypic behaviors, with a greater number of head dips ( $P < 0.01$ ; Fig. 5A) when compared to normal diet group. Similarly, female offspring of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation showed stereotypic behaviors, with a greater number of head dips ( $P < 0.01$ ; Fig. 5B) when compared to the female offspring of the normal diet group.

### Social play behavior

Fig. 6 shows the performance of male and female offspring in the social play behavior test. It can be observed that the male offspring of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation presented a significant reduction ( $P < 0.01$ ; Fig. 6A) in social exploration time when compared to those of the normal diet group. There was no difference between the experimental groups in following time ( $P > 0.05$ ; Fig. 6B). There was a reduction in both social exploration time ( $P < 0.01$ ; Fig. 6C) and following time ( $P < 0.05$ ; Fig. 6D) in female offspring of dams treated with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation when compared to those of the normal diet group.

### Object recognition test

Fig. 7 shows the performance of the male and female offspring in the object recognition test. Short-term memory retention test performed 2 hours after training showed that the male offspring of dams treated with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation spent more time exploring the familiar object ( $P < 0.05$ ; Fig. 7A) and less time exploring the novel object ( $P < 0.05$ ; Fig. 7B), and they had a lower RI ( $P < 0.05$ ; Fig. 7C) when compared to those of the normal diet group. With respect to the female offspring, there was no difference between the experimental groups in the analyzed parameters ( $P > 0.05$ ; Fig. 7D–F).

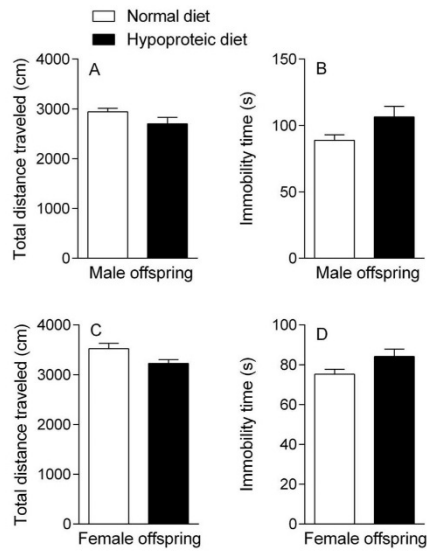


**Figure 3** The effects of maternal protein malnutrition on the latency in seconds to reach the nest bedding area, total time in seconds spent by the pup in the nest bedding area, and total number of entries into the nest bedding area during the homing behavior test of male (A–C) and female (D–F) offspring on PND 13. Each column represents the mean ( $\pm$ SEM) of eight animals per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  when compared to offspring of the normal diet group. Data analyzed by Student's *t*-test.

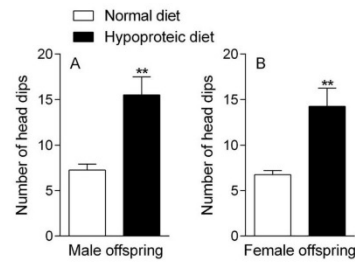
**Discussion**

Maternal protein restriction is associated with the emergence of several adverse effects of offspring

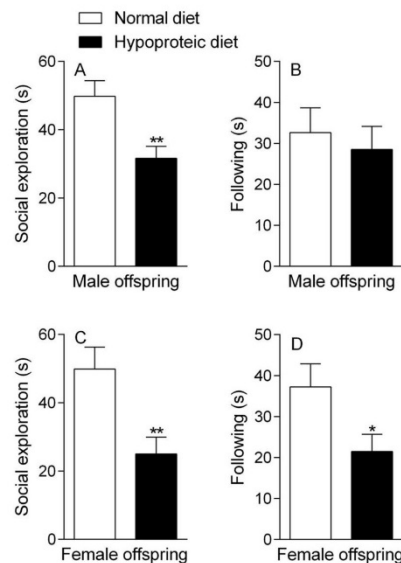
neurological development, such as alteration in the number of cells, synapses, and neuronal myelination,<sup>26</sup> and abnormalities in hippocampal formation.<sup>27</sup> In addition, maternal protein restriction may alter neurochemical aspects of the central nervous system of offspring, causing changes in the number and distribution of neurotransmitter receptors and, consequently, alterations in behavioral expression<sup>28</sup> and cognitive function.<sup>29</sup> The previous data reaffirm the importance of adequate maternal nutrition for the healthy development of offspring in neuroanatomical, neurochemical, behavioral, and cognitive aspects. However, one aspect that has not yet been addressed



**Figure 4** The effects of maternal protein malnutrition on the total distance traveled in centimeters and the time in seconds of immobility in the open field test of male (A and B) and female (C and D) offspring on PND 30–32. Each column represents the mean ( $\pm$ SEM) of eight animals per group. Data were analyzed by Student's *t*-test.



**Figure 5** The effects of maternal protein malnutrition on the number of head dips in the hole-board test of male (A) and female (B) offspring on PND 30–32. Each column represents the mean ( $\pm$ SEM) of eight animals per group. \*\* $P < 0.01$  compared to the offspring of the normal diet group. The data were analyzed by Student's *t*-test.



**Figure 6** The effects of maternal protein malnutrition on the time in seconds spent on social exploration (sniffing any part of the body of the test partner, including the anogenital area) and the time in seconds of following (running forward in the direction of or pursuing the other subject, who moves away) in the social play test of male (A and B) and female (C and D) offspring on PND 30–32. Each column represents the mean ( $\pm$ SEM) of 8 animals per group. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  when compared to the offspring of the normal diet group. Data were analyzed by Student's *t*-test.

is the relationship between maternal protein malnutrition and psychiatric disorders in offspring, specifically regarding the onset of ASD. Therefore, we investigated whether or not maternal protein malnutrition in rats induces behavioral features that resemble some of the core and associated symptoms displayed by ASD patients.

ASD is characterized by difficulties in social communication, poor reciprocal social interaction, and behaviors that are restricted and repetitive in nature.<sup>11</sup> Therefore, behavioral tests used in this study measure factors that resemble these main behavioral characteristics observed in humans with ASD.

Litters of dams fed a hypoproteic diet had a lesser weight gain during lactation, a finding which is in line with what has been previously reported.<sup>19,29,30</sup> The reduced body weight of the litters of dams fed a hypoproteic diet could be due to protein deficiency during the intrauterine and neonatal period. Thus, protein-deficient diets have been implicated as important regulators of metabolic programming and future health outcomes of rats.<sup>29,30</sup>

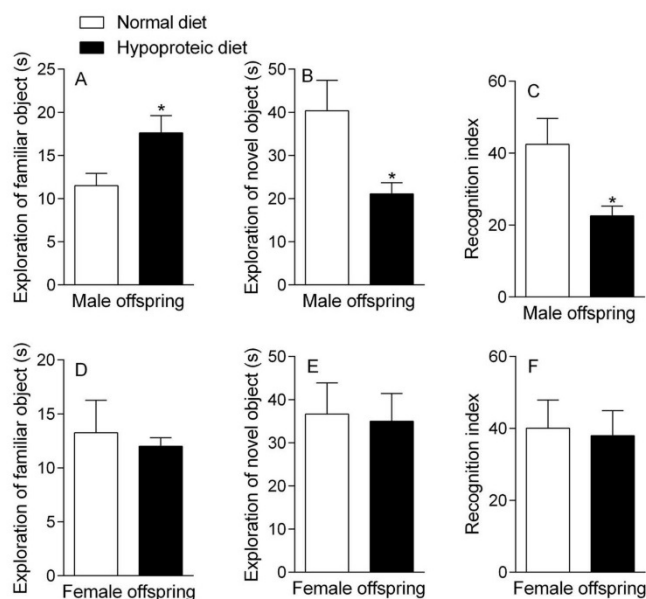
Moreover, we found that male and female pups of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy

and lactation, when separated from their mother and siblings, displayed a decrease in the number of USV emissions. USVs have an essential communicative role in mother–offspring interaction, serve as situation-dependent affective signals,<sup>31</sup> and are used as a means of social communication.<sup>32</sup> Therefore, the altered USV profile displayed by male and female pups may indicate a reduced ability to communicate with the mother, as well as a deficit in social communication. In addition, impaired communication of the pups with their mothers is a typical symptom of autism, as confirmed by a previous study showing that a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure leads to reduction in USVs in the pups.<sup>33</sup> Similarly, deficits in USVs of pups after maternal separation were found in other ASD animal models.<sup>34</sup>

Another test performed was the homing behavior, which provided a measure of social discrimination in order to detect the cognitive, sensory (olfactory), and motor abilities necessary to discriminate between a neutral odor and the mother's odor.<sup>8,35</sup> Learned association between maternal odors and maternal stimulation is also crucial for the development of social behavior and social recognition.<sup>36</sup> In our study, we observed that male and female pups of dams fed a hypoproteic diet during pregnancy and lactation were unable to use olfactory cues to discriminate between a neutral odor and the mother's odor in the homing behavior test. The homing test allowed us to measure early motivation towards relevant social stimuli. Impaired homing performance has been associated with the interaction deficits observed in autistic children early in infancy.<sup>8,37</sup>

In addition to deficits in mother–offspring communication and olfactory discrimination, which may indicate deficits in social communication and social discrimination beginning in the first days of life, repetitive behavior is also a behavioral pattern associated with autism. In this study, we performed the hole-board test in order to evaluate repetitive patterns of head dipping that are considered to be parameters of stereotyped behavior.<sup>38</sup> We found that male and female offspring of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation presented stereotypic behavior in the hole-board test, with an increase in the number of head dips (repetitive behavior) which are behavioral patterns presented by autistic patients.

Besides this stereotyped behavior, ASD is also characterized by deficits in social play, with difficulties adjusting to diverse social contexts, failure to develop peer relationships, and difficulties making friends.<sup>11,39,40</sup> In this sense, the evaluation of the social play behavior in rodents is an important tool for the evaluation of deficits in social skills presented by ASD patients. Our results showed that male and female offspring of dams fed with a hypoproteic diet



**Figure 7** Effects of maternal protein malnutrition on exploration of a familiar object (in seconds), exploration of a novel object (in seconds), and the RI in the object recognition test of male (A–C) and female (D–F) offspring on PND 30–32. Each column represents the mean ( $\pm$ SEM) of eight animals per group. \* $P < 0.05$  when compared to the offspring of the normal diet group. Data were analyzed by Student's *t*-test.

during pregnancy and lactation presented a decrease of social play when compared to those of the normal diet group. ASD patients show marked deficits in social interaction, including lacking or atypical social play behavior.<sup>11</sup> Social play has a crucial role in the identification and diagnosis of ASD.<sup>39</sup> The play of children with ASD is less likely to engage the interest of other children. Lack of socialized patterns of play and the failure to engage in play with peers can lead, in turn, to further social isolation. Since the opportunity to engage in social play is crucial for acquiring proper social and cognitive skills, the lack of social play in children with ASD has deleterious effects on their development, leading to long-lasting deficits in self-awareness, social competence, problem solving, and behavioral flexibility.<sup>10</sup>

Children with autism are insistent on sameness, present ritualized patterns of behavior, and tend to explore familiar objects.<sup>11</sup> Therefore, we used the object recognition test to evaluate whether the maternal protein restriction would affect the tendency to explore novel objects. Normally, animals exposed to a familiar object and a new object spend more time exploring the new object.<sup>41</sup> In our study, we found that the male offspring of dams fed with a hypoproteic diet during pregnancy and lactation presented an increase in exploration time of the familiar object, a reduction in the exploration time of the novel object,

and a reduction in RI when compared to those of the normal diet group. Therefore, we suggest that the increase in the exploration time of the familiar object and the reduction in the exploration time of the new object are related to the insistence on sameness and the desire for familiar objects found in ASD individuals, as demonstrated by the persistence of animals who continued to explore the familiar object even in the presence of a new object.

An important observation is that the data obtained so far are not influenced by a loss of locomotor activity, since there was no change in the locomotor activity in the open field between the experimental groups in either male or female offspring.

In conclusion, our results show that maternal protein malnutrition induces offspring behaviors that resemble some core and associated ASD symptoms. This is an important study since the causes and proper treatment for ASD are not known. Thus, with the knowledge that the incidence of ASD is increasing in the population, it is important to identify factors that predispose the development of ASD, such as maternal protein malnutrition.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the excellent technical support of José dos Reis Pereira and collaboration of Ana Cláudia Alves Freire Ribeiro.



### Disclaimer statements

**Contributors** All authors contributed equally.

**Funding** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG #01483/2013, AG-P) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, #456078/2014-2; FCV). The FAPEMIG and CNPq had no further role in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of the data; the writing of the report; or the decision to submit the paper for publication.

**Conflict of interest** No potential conflict of interest was reported by the authors. The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

**Ethics approval** None.

### References

- Reyes-Castro LA, Padilla-Gómez E, Parga-Martínez NJ, Castro-Rodríguez DC, Quirarte GL, Díaz-Cintra S, et al. Hippocampal mechanisms in impaired spatial learning and memory in male offspring of rats fed a low-protein isocaloric diet in pregnancy and/or lactation. *Hippocampus* 2018;28:18–30.
- Gressens P, Muaku SM, Besse L, Nsege E, Gallego J, Delpech B, et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;103:21–35.
- Feoli AM, Leite MC, Tramontina AC, Tramontina F, Posser T, Rodrigue L, et al. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain Res* 2008;1187:33–41.
- Belluscio LM, Berardino BG, Ferroni NM, Ceruti JM, Cánepa ET. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiol Behav* 2014;129:237–54.
- Reyes-Castro LA, Rodríguez JS, Charco R, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:39–45.
- Zamberletti E, Gabaglio M, Parolaro D. The endocannabinoid system and autism spectrum disorders: insights from animal models. *Int J Mol Sci* 2017;18:E1916.
- Chadman KK. Animal models for autism in 2017 and the consequential implications to drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2017;12:1187–94.
- Servadio M, Vanderschuren LJ, Trezza V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: do “autistic” rodents exist? *Behav Pharmacol* 2015;26:522–40.
- Servadio M, Melancia F, Manduca A, di Mais A, Schiavi S, Cartocci V, et al. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. *Transl Psychiatry* 2016;6:e902.
- Melancia F, Servadio M, Schiavi S, Campolongo P, Giusti-Paiva A, Trezza V. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. *Behav Brain Res* 2017;321:113–122.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DMS-5*. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
- Jordan R. Social play and autistic spectrum disorders: a perspective on theory, implications and educational approaches. *Autism* 2003;7:347–60.
- Dawson G, Carver L, Meltzoff AN, Panagiotides H, McPartland J, Webb SJ. Neural correlates of face and object recognition in young children with autism spectrum disorder, developmental delay, and typical development. *Child Dev* 2002;73:700–17.
- Wöhr M, Schwarting RK. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res* 2013;354:81–97.
- Scattoni ML, Gandhi SU, Ricceri L, Crawley JN. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T + tf/J mouse model of autism. *PLoS One* 2008;3:e3067.
- Makanjuola RO, Hill G, Maben I, Dow RC, Ashcroft GW. An automated method for studying exploratory and stereotyped behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 1977;52:271–7.
- Trezza V, Baarendse PJ, Vanderschuren LJ. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31:463–9.
- Lazic SE, Essioux L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci* 2013;22:14–37.
- Batista TH, Veronesi VB, Ribeiro ACAF, Giusti-Paiva A, Vilela FC. Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring. *Nutr Neurosci* 2017;20:437–42.
- Noldus LP, Spink AJ, Tegelenbosch RA. Ethovision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2001;33:398–414.
- Trezza V, Vanderschuren LJ. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 2008;197:217–27.
- Trezza V, Baarendse PJ, Vanderschuren LJ. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:2560–73.
- Reger ML, Hovda DA, Giza CC. Ontogeny of rat recognition memory measured by the novel object recognition task. *Dev Psychobiol* 2009;51:672–8.
- Anderson MJ, Barnes GW, Briggs JF, Ashton KM, Moody EW, Joyne RL, et al. Effects of ontogeny on performance of rats in a novel object-recognition task. *Psychol Rep* 2004;94:437–43.
- Rech RL, de Lima MN, Dornelles A, Garcia VA, Alcalde LA, Vedana G, et al. Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. *Exp Gerontol* 2010;45:351–6.
- Debassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res Bull* 1994;35:57–61.
- Debassio WA, Kemper TL, Tonkiss J, Galler JR. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull* 1996;41:379–83.
- Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 1996;20:389–402.
- Reyes-Castro LA, Rodríguez JS, Charco R, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:39–45.
- Reyes-Castro LA, Rodríguez JS, Rodríguez-González GL, Chavira R, Bautista CJ, McDonald TJ, et al. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res* 2012;227:324–9.
- Wöhr M, Schwarting RK. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res* 2013;354:81–97.
- Pasciuto E, Borrie SC, Kanellopoulos AK, Santos AR, Cappuyns E, D’Andrea L, et al. Autism spectrum disorders: translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem* 2015;124:71–87.
- Kirsten TB, Queiroz-Hazarbassanov N, Bernardi MM, Felicio LF. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. *Life Sci* 2015;130:12–7.
- Shu W, Cho JY, Jiang Y, Zhang M, Weisz D, Elder GA, et al. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9643–8.
- Bignami G. Economical test methods for developmental neurobehavioral toxicity. *Environ Health Perspect* 1996;104:285–98.
- Terry LM, Johanson IB. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats’ responses to odors. *Dev Psychobiol* 1996;29:353–77.
- Laviola G, Ognibene E, Romano E, Adriani W, Keller F. Gene-environment interaction during early development in the

**Batista et al. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring**

- heterozygous reeler mouse: clues for modelling of major neurobehavioral syndromes. *Neurosci. Biobehav Rev* 2009;33:560–72.
- 38 Makanjuola RO, Hill G, Maben I, Dow RC, Ashcroft GW. An automated method for studying exploratory and stereotyped behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1977;52:271–7.
- 39 Jordan R. Social play and autistic spectrum disorders: a perspective on theory, implications and educational approaches. *Autism* 2003;7:347–60.
- 40 Dölen G. Autism: oxytocin, serotonin, and social reward. *Soc Neurosci* 2015;10:450–65.
- 41 Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 2010;215:244–54.