

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CÍNTIA ONOFRA DE NOVAIS

**OBESIDADE MATERNA POR REDUÇÃO DE NINHADA INDUZ
COMPORTAMENTO TIPO AUTISTA NA PROLE**

Alfenas / MG

2020

CÍNTIA ONOFRA DE NOVAIS

**OBESIDADE MATERNA POR REDUÇÃO DE NINHADA INDUZ
COMPORTAMENTO TIPO AUTISTA NA PROLE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas
Área de concentração: Neurociências e Comportamento.
Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti

Alfenas / MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Novais, Cíntia Onofra de
N935o Obesidade materna por redução de ninhada induz comportamento
tipo autista na prole / Cíntia Onofra de Novais – Alfenas, MG, 2020.
81 f.: il. –

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) –
Universidade Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia

1. Hiperfagia. 2. Obesidade. 3. Autismo. 4. Sinaptofisina.
I. Giusti Fabiana Cardoso Vilela. II. Título.

CDD- 612.3

Cíntia Onofra de Novais

**OBESIDADE MATERNA POR REDUÇÃO DE NINHADA INDUZ
COMPORTAMENTO TIPO AUTISTA NA PROLE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Defesa apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas
Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em: 26 de novembro de 2020

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti
Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten
Instituição: Universidade Paulista – UNIP-SP

Profa. Dra. Fernanda Barbosa Lima
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC-SC



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Barbosa Lima, Usuário Externo**, em 26/11/2020, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Berti Kirsten, Usuário Externo**, em 26/11/2020, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Cardoso Vilela Giusti, Usuário Externo**, em 26/11/2020, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0410537** e o código CRC **822E9AB7**.

Dedico a Deus, aos meus pais e irmãos, ao meu Mestre, ao meu noivo, a minha orientadora e aos meus amigos pelo apoio na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de conhecimento e evolução diária e ao seu filho Jesus Cristo pelos exemplos de bondade e sabedoria.

Aos meus pais Antônio e Lourdes pela oportunidade de vida, pelos ensinamentos e pelo colo amigo sempre que necessário.

Aos meus irmãos, em especial ao Rodrigo que desde pequena me incentivava a estudar e a quem eu admiro.

Ao meu Mestre Dr. Celso Charuri por me apresentar os Princípios que me norteiam para construção para um Mundo Bem Melhor.

Ao meu noivo Marcelo, que foi com quem aprendi a buscar vários lados da mesma situação a fim de encontrar uma Verdade absoluta, ele me ensina a ter paciência para passar por momentos diversos e me mostrou que o diálogo é sempre o melhor caminho para esclarecer qualquer situação.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela, que carinhosamente chamamos de Fabi, pela ocupação em formar excelentes profissionais, pelo modo que trata cada uma de nós, pelo respeito ao nosso tempo de amadurecimento, pelo tempo doado a nós mesmo quando está de férias, enfim, por tornar possível e prazeroso este processo.

Ao Prof. Dr. Alexandre Guisti Paiva pelas dicas cruciais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório Doutorando Fernando Vitor Vieira, Dra. Ana Claudia Ribeiro, Dra. Merelym Ketterym de Oliveira, Dra. Tatiane Helena Batista, Doutoranda Jádina dos Santos Vieira, Doutoranda Viviana Carolina Trufillo Rojas, Dr. Wesley Fernandes Fonseca, Profa. Dra. Bruna Kalil e a Mestranda Bárbara Garcia Ferri pela ajuda em diversos estágios deste trabalho e acima de tudo pelos momentos únicos e felizes que passamos juntos, principalmente na companhia de uma xícara de café.

À minha amiga Dra. Camilla Ribeiro Vieira, que me acolheu de braços abertos no início do meu mestrado como aluna especial.

À minha amiga Ma. Laís Leite Ferreira, por tanta ajuda no início do meu mestrado e que mesmo cansada tinha um tempinho para me ajudar.

À minha amiga Vanessa Lira Leite, a quem sempre me ofereceu conselhos sábios e que me ajuda ver qual ponto em mim é necessário colocar mais atenção em busca de um Eu melhor.

Aos meus amigos da Pró-Vida pela companhia rumo ao mesmo ideal, pois juntos somos mais fortes.

À secretária do Programa de Biociências Aplicadas à Saúde, Adriana Aparecida Pereira pelo carinho e a disposição a me ajudar.

Ao técnico José Reis pela dedicação e cuidado com os animais, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos animais que sem eles esse trabalho não poderia ser desenvolvido e aos quais me dediquei com muito carinho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“[...] se você também pretende um Mundo Melhor, saiba que o trabalho é um trabalho de cada um dentro de si.”

(CHARURI, 2008)

RESUMO

A obesidade é uma doença metabólica crônica que está associada ao desenvolvimento de várias comorbidades. Estudos em humanos demonstram uma incidência de prejuízos no neurodesenvolvimento, como o autismo em filhos de mães obesas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o comportamento de sua prole e a expressão de sinaptofisina no córtex e hipocampo, uma vez que esta proteína foi associada com o desenvolvimento do autismo. Para isso, utilizamos o modelo de redução de ninhada para indução da obesidade, sendo considerados dois grupos experimentais: ninhada reduzida (NR-F1) com 4 filhotes por ninhada e ninhada normal (NN-F1) contando 12 filhotes por ninhada. A obesidade foi caracterizada em ratas NR-F1 no dia pós natal (PND) 56 e avaliados o comportamento materno (PND2-8) e atividade locomotora (PND5) em ratas lactantes. Sua prole (F2) foi avaliada durante a lactação quanto o número de vocalizações ultrassônicas (PND5), e no teste de comportamento de retorno a maravalha do ninho (PND13), e na idade pré-púbere (PND28-32) nos testes de comportamento social de brincar, placa com furos, reconhecimento de objetos, claro-escuro, de nado forçado e no campo aberto. No final dos experimentos, o cérebro foi removido e dissecado o hipocampo e o córtex pré-frontal para quantificar a sinaptofisina por Western blotting. Nossos dados demonstraram que a redução no tamanho da ninhada foi capaz de induzir a obesidade materna, mas não alterou os parâmetros relacionados à obesidade na prole. A prole NR-F2 apresentou déficits na comunicação social precoce, discriminação olfativa, comportamento lúdico social e exploração de objetos, além de aumentar os movimentos repetitivos e estereotipados e apresentar comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso. Também houve mudanças na quantidade de sinaptofisina no hipocampo e no córtex pré-frontal da prole de mães com menos ninhadas. Em conclusão, a obesidade materna pela redução da ninhada prejudica o neurodesenvolvimento comportamental, induzindo sintomas semelhantes ao autismo na prole. Este estudo é importante para alertar a população mundial sobre as consequências negativas da obesidade materna.

Palavra-chave: Superalimentação neonatal. Obesidade. Prejuízos no neurodesenvolvimento. Autismo. Sinaptofisina.

ABSTRACT

Obesity is a chronic metabolic disease associated with the development of various types of eating habits; it's considered a public health problem. Studies with humans demonstrate that there are impairments in neurodevelopment such as: cerebral palsy, autism, schizophrenia and cognitive impairments in children of obese mothers. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of maternal obesity induced by reduced litter size on the behavior of their offspring. For this purpose, we used the litter size reduction model to induce obesity, considering two experimental groups: reduced litter size (SL-G1) with 4 puppies per litter and normal litter (NL-G1) counting 12 puppies per litter. Obesity was characterized in adult SL-G1 rats and maternal behavior and locomotor activity were evaluated in lactating rats. Their offspring (G2) were assessed during lactation by the number of ultrasonic vocalizations (PND5) and by the Homing Behavior (PND13), and the prepubertal age (PND18-32) by the social Play Behavior, Hole-board, Objects Recognition, Light-Dark, Forced Swimming and in the Open Field tests. At the end of the experiments, the brain was removed and dissect the hippocampus and prefrontal cortex to quantify the synaptophysin by Western blotting. Our data demonstrated that the reduction in litter size was able to induce maternal obesity but did not alter parameters related to obesity in the offspring. The SL-G2 offspring showed deficits in early social communication, olfactory discrimination, social play behavior and the exploration of objects, in addition to increasing repetitive and stereotyped movements, and exhibit type-depressive and type-anxious behaviors. There were also changes in the synaptophysin amount in the hippocampus and prefrontal cortex of the offspring from reduced litter dams. In conclusion, maternal obesity by litter reduction impairs behavioral neurodevelopment, inducing autism-like symptoms in the offspring. This study is important to alert the world population about the negative consequences of maternal obesity.

Keyword: Neonatal overfeeding. Obesity. Impaired neurodevelopment. Autism. Synaptophysin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Confirmação de prenhes	28
Figura 2	Ninhada Normal e Ninhada Reduzida	29
Figura 3	Diferença de tamanho entre fêmeas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida no período neonatal	29
Figura 4	Alguns dos comportamentos maternos observados	30
Figura 5	Vocalização ultrassônica	32
Figura 6	Retorno à maravalha do ninho	33
Figura 7	Reconhecimento de objetos	34
Figura 8	Placa com furos	35
Figura 9	Comportamento pré-púbere de brincadeira	36
Figura 10	Claro-Escuro	36
Figura 11	Nado Forçado	37
Figura 12	Campo Aberto	38
Figura 13	Efeito da redução do tamanho da ninhada no ganho de peso do grupo F1	42
Figura 14	Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre a adiposidade das ratas adultas (PND56) do grupo F1	43
Figura 15	Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o índice de <i>Lee</i> de ratas adultas (PND56) do grupo F1	43
Figura 16	Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada no comportamento materno e não materno do grupo F1	44
Figura 17	Efeito da redução do tamanho da ninhada na atividade locomotora do grupo F1	45
Figura 18	Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o ganho de peso de seus descendentes	46
Figura 19	Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o Índice de <i>Lee</i> de seus descendentes	47
Figura 20	Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a adiposidade de seus descendentes.	48
Figura 21	Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a vocalização ultrassônica de seus descendentes.	49
Figura 22	Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de retorno a maravalha do	50

ninho de seus descendentes.

- Figura 23 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de placa com furos de seus descendentes. 51
- Figura 24 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de brincadeira de seus descendentes. 52
- Figura 25 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance de reconhecimento de objetos de seus descendentes. 53
- Figura 26 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de claro-escuro de seus descendentes. 54
- Figura 27 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de nado forçado de seus descendentes. 55
- Figura 28 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a atividade locomotora de seus descendentes. 56
- Figura 29 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a quantificação de sinaptofisina no hipocampo de seus descendentes. 58
- Figura 30 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a quantificação de sinaptofisina no hipocampo de seus descendentes. 59

LISTA DE TABELAS

Quadro 1	Representação esquemática do delineamento experimental	27
Quadro 2	Correlação entre os principais sintomas de crianças com TEA, comportamento tipo-autista em roedores e os resultados encontrados em nosso trabalho.	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3.2.1	Caracterização da obesidade - F1	23
3.2.2	Ratas lactantes - F1	23
3.2.3	Prole – F2	23
3.2.4	Quantificação de sinaptofisina por Western blotting – F2	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	ANIMAIS.....	25
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.3	ACASALAMENTO – F0	27
4.4	INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE	28
4.4.1	Redução do tamanho da ninhada – F1.....	28
4.4.2	Acompanhamento do ganho de peso – F1	29
4.4.3	Índice de Lee e peso do tecido adiposo – F1.....	30
4.5	AVALIAÇÕES DAS RATAS LACTANTES - F1.....	30
4.5.1	Comportamento Materno – F1	30
4.5.2	Campo aberto – F1	31
4.6	PADRONIZAÇÕES PARA TESTES COMPORTAMENTAIS – F2	31
4.7	AVALIAÇÃO DA PROLE - F2	31
4.7.1	Acompanhamento do ganho de peso - F2	31
4.7.2	Índice de Lee e peso do tecido adiposo – F2	31
4.7.3	Vocalização Ultrassônica (VUS) – F2	32
4.7.4	Comportamento de preferencia pela maravalha do ninho – F2 ...	32
4.7.5	Reconhecimento de objetos – F2	33
4.7.6	Placa com furos – F2	34
4.7.7	Comportamento social de brincar – F2	35
4.7.8	Claro – Escuro – F2	36
4.7.9	Nado forçado – F2	37
4.7.10	Campo aberto – F2	37
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE SINAPTOFISINA POR WESTERN BLOTTING - F2.....	38
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6	RESULTADOS	41
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE DE RATAS F1	41
6.1.1	Avaliação do peso das ratas - F1	41
6.1.2	Peso do tecido adiposo de ratas adultas – F1	42

6.1.3	Avaliação do Índice de Lee de ratas adultas – F1	43
6.2	AVALIAÇÕES DAS RATAS LACTANTES - F1	44
6.2.1	Comportamento Materno – F1	44
6.2.2	Campo aberto – F1	45
6.3	AVALIAÇÃO DOS FILHOTES - F2	45
6.3.1	Ganho de peso - F2	46
6.3.2	Índice de Lee filhotes - F2	46
6.3.3	Peso do tecido adiposo - F2	47
6.3.3	Vocalização Ultrassônica (VUS) – F2	48
6.3.4	Comportamento de retorno para o ninho – F2	49
6.3.5	Placa com furos – F2	50
6.3.6	Comportamento social de brincar – F2	51
6.3.7	Reconhecimento de Objetos – F2	52
6.3.8	Claro – Escuro – F2	53
6.3.9	Nado forçado – F2	54
6.3.10	Campo aberto – F2	55
6.4	QUANTIFICAÇÃO DE SINAPTOFISINA POR WESTERN BLOTTING – F2	57
6.4.1	Sinaptofisina – Hipocampo – F2	57
6.4.2	Sinaptofisina – Córtex – F2	58
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO.....	80

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal resultante do desequilíbrio prolongado entre o consumo alimentar e o gasto energético e está associada com o desenvolvimento de comorbidades como diabetes mellitus tipo 2, inflamação crônica, hipertensão, dislipidemia, alguns tipos de câncer, dificuldade / incapacidade de se locomover, osteoartrite, apneia do sono e Acidente Vascular Cerebral. Sua etiologia é multifatorial e está relacionada a fatores genéticos, a comportamentos sedentários, a excesso alimentar em especial o excesso de carboidrato e de lipídeos ultra processados, a fatores socioeconômicos (antes a obesidade era predominante nas classes mais ricas, hoje é predominante nos grupos socioeconômicos mais baixos), ao uso de alguns fármacos como glicocorticóides, antidiabéticos, antidepressivos, antipsicóticos e também está relacionada a algumas doenças como síndrome de Cushing, hipotireoidismo e síndrome dos ovários policísticos e alterações na microbiota intestinal (BADILLO-SUÁREZ, RODRÍGUEZ-CRUZ, NIEVES-MORALES, 2017; GARIBALDE *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2009; PINHO *et al.*, 2013; SARTURI *et al.*, 2010; SMITH, SMITH, 2016).

Em uma grande parte da história humana, o excesso de peso foi considerado indicação de saúde bem como riqueza e prosperidade. Os gregos antigos foram os primeiros, no entanto, perceber os perigos da obesidade e sua associação com doença, sendo Hipócrates (460aC - 370aC) o primeiro a relacionar a obesidade com infertilidade e morte precoce. Ele também foi o primeiro a associar a modificação da dieta com a melhoria da saúde (HASLAM, 2007; KOMAROFF, 2016).

Anterior ao século XVIII, a obesidade era descrita como excesso de peso ou corpulência, sendo registrada pela primeira vez no século XVIII e associada com varias doenças. No início do século XX, surgiu uma preocupação com o baixo peso corporal por causa da ameaça da pneumonia e tuberculose, sendo o peso saudável dado pela associação entre peso corporal e mortalidade e o excesso de peso definido como o peso que excedeu o valor de referência. Nas primeiras décadas do século XX, surgiram os primeiros relatos da associação da obesidade com aumento da mortalidade (EKNOYAN, 2006; HASLAM, 2007; KOMAROFF, 2016).

Atualmente o método mais utilizado mundialmente para classificar o peso é o índice de massa corporal (IMC) que é calculado utilizando o peso corporal em

quilogramas dividido pela altura em metros quadrados (kg / m^2). De acordo com IMC os indivíduos são alocados em cinco categorias diferentes: baixo peso ($<18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$), normal ($18,5 - 24,9 \text{ kg} / \text{m}^2$), sobrepeso ($25,0 - 29,9 \text{ kg} / \text{m}^2$), obeso classe 1 ($30,0 - 34,9 \text{ kg} / \text{m}^2$), obeso classe 2 ($35,0 - 39,9 \text{ kg} / \text{m}^2$) e obeso classe 3 ($\leq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$) de acordo com o cálculo de IMC foi definida em 1983 sendo hoje em dia um método internacional padrão utilizado para classificação de peso (ENGIN, 2017; KOMAROFF, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (2018) aponta que a obesidade mundial quase triplicou desde 1975 e que em 2016 mais de 650 milhões de adultos eram obesos, 380 milhões de crianças e adolescentes estavam acima do peso ou obesas.

A obesidade entre crianças tem implicações ao longo da vida, como a prevalência de obesidade na vida adulta (OHLENDORF, *et al.*, 2019) e suas causas estão relacionados ao estilo de vida sedentário, consumo de dieta altamente calórica, jogos eletrônicos, fatores genéticos, estado nutricional da mãe e alimentação infantil durante o primeiro ano de vida (PATEL, SRINIVASAN, 2010; SCHWARTZ, 2006; SMITH, SMITH, 2016).

As consequências da obesidade em modelos animais foram estudadas pela primeira vez em 1949 em ratos ao ofertar dieta altamente palatável. Desde então muitos estudos foram desenvolvidos a fim de entender os mecanismos para gerar a obesidade e também para sua prevenção, sendo estudados, principalmente em roedores nos quais são utilizados vários métodos de estudo da obesidade como: o camundongo *ob/ob* geneticamente obeso, a indução da obesidade por excesso de alimentos altamente palatáveis, dietas hiperlipídica e com grande quantidade de carboidrato, assim como a redução do tamanho de ninhada. Esses modelos animais induzem a doença de maneira mais semelhante à gênese de obesidade em humanos (ENES-MARQUES, GIUSTI-PAIVA, 2018; FERNANDES *et al.*, 2016; HARIRI, THIBAUT, 2010; INGLE, 1949; RIBEIRO *et al.*, 2018; SPEAKMAN *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que intervenções nutricionais gestacionais ou perinatais, podem gerar prejuízos no neurodesenvolvimento de seus descendentes. No estudo de Bukhari, Clark e Williamson, (2018) utilizando um modelo de programação nutricional, foi observado um aumento no comportamento tipo ansioso nas proles cujas mães foram alimentadas com uma dieta rica em frutose quando comparadas com o controle que consumiu ração normal.

Em um estudo utilizando dieta rica em gordura com ratas *Wistar* adultas durante 8 semanas antes do acasalamento, durante a gestação e lactação foi observado um aumento do peso dos filhotes tanto macho quanto fêmea após o dia pós natal 12 (PND12), sendo observado ao desmame um aumento na quantidade das gorduras subcutâneas, viscerais e gordura marrom, de machos e fêmeas quando comparado aos filhotes de mães controle que receberam ração normal. (ALMEIDA *et al.*, 2017)

Utilizando a dieta de cafeteria em camundongos durante a gestação, foram observadas alterações no comportamento materno e atraso no desenvolvimento físico e neurológico, apresentando impacto sobre o comportamento emocional na prole adolescente (RIBEIRO *et al.*, 2018).

A redução no tamanho da ninhada também foi demonstrada eficiente como indutor de obesidade, modulando permanentemente a adiposidade e circuitos hipotalâmicos que controlam a ingestão de alimentos e equilíbrio energético na idade adulta (HABBOUT, ROCHETTE, VERGELY, 2013; PLAGEMANN *et al.*, 1998).

A redução do tamanho da ninhada em roedores foi primeiramente demonstrada por Kennedy (1957) e tem sido usado para induzir a supernutrição na vida pós-natal imediata da prole e utilizada também para investigar as consequências do ganho de peso excessivo pós-natal (FIOROTTO, 1991; MOZES, SEFCIKOVA, RACEK, 2014).

O excesso de peso no modelo de redução de ninhada é devido à ausência de competição e uma maior ingestão de leite causada por maior disponibilidade, e, além disso, aumento da concentração de gordura no leite, provocando consequências sobre a prole durante o desenvolvimento físico e neurocomportamental (FIOROTTO, 1991; HABBOUT, ROCHETTE, VERGELY, 2013; MOZES, SEFCIKOVA, RACEK, 2014; PLAGEMANN *et al.*, 1998).

Debarba (2017) utilizou a redução do tamanho da ninhada (3 filhotes, ninhada reduzida (NR), 10 filhotes, ninhada normal (NN) e de 16 filhotes, ninhada grande (NG) e foi observado maior peso corporal ao desmame (PND21) e essa diferença foi mantida até a idade adulta (PND60).

Em outro estudo com redução do tamanho da ninhada utilizando ratos *Wistar* na proporção de 4 filhotes (NR) e 10-12 filhotes (NN) por lactante, foi observado ao desmame que a quantidade de gordura e de leptina havia dobrado nos animais criados em NR, e também que a hiperinsulinemia parece desempenhar um papel fundamental para o desenvolvimento de resistência à leptina e risco de obesidade

ao longo da vida destes ratos. Sendo assim, os autores sugeriram que o estado nutricional no período pós-natal imediato pode ter um impacto no risco cardiometabólico na vida adulta (SCHMIDT *et al.*, 2001).

Enes Marques e Giusti-Paiva em 2018, utilizando a redução de ninhada na proporção de três filhotes (2 machos e 1 fêmea) para a ninhada foi reduzida (NR) e 12 filhotes (máximo 6 machos por ninhada) para a ninhada normal (NN), a prole NR, apresentou um aumento de peso desde o 8º dia de lactação até a fase adulta no PND 56 e aumento no índice de *Lee* em fêmeas. O índice de *Lee* em roedores se compara ao IMC de humanos.

Assim, a nutrição materna adequada é fundamental para o desenvolvimento físico, manutenção do crescimento e desenvolvimento de funções e sistemas orgânicos da prole, sendo que uma alimentação inadequada no período pós-natal pode influenciar negativamente no neurodesenvolvimento e no comportamento da prole (BLACK *et al.*, 2013; MORGANE *et al.*, 1978).

Estudos recentes em humanos têm feito à associação entre obesidade materna e o transtorno do espectro autista (TEA) sendo observada uma associação significativa ao aumento do risco de se ter filhos com TEA (KRAKOWIAK *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2018).

O TEA impacta significativamente nos custos pessoais, sociais e econômicos assim como na qualidade de vida e independência funcional. Nas últimas décadas houve um aumento dos casos de crianças diagnosticadas com TEA e de acordo com a Organização Mundial da Saúde hoje em dia uma em cada 160 crianças são diagnosticadas com TEA e comumente acompanhadas de alguns transtornos psiquiátricos como a ansiedade e depressão (MAKUSHKIN, MAKAROV, PASHKOVSKIY, 2019; ROSEN, *et al.*, 2018; STEFANIK *et al.*, 2018; WHO, 2019)

O TEA é uma desordem neurobiológica complexa, derivada da palavra grega *autos*, que significa um eu isolado, caracterizada por déficits persistentes na comunicação social e interação social e na reciprocidade socioemocional, assim como comportamento com padrões restritos e repetitivos. As desordens geralmente são diagnosticadas até os 5 anos de vida e sua ocorrência é cinco vezes maior em meninos em comparação as meninas (BHAT *et al.*, 2014; DSM-5, 2014; WHO, 2019).

Os comportamentos típicos de indivíduos com TEA veem sendo muito estudados principalmente em roedores, como os déficits de comunicação que são

um fenótipo importante em pacientes com TEA. Estudos recentes utilizam a quantificação de vocalizações ultrassônicas (VUS) em filhotes para avaliar a capacidade de comunicação social em roedores (BATISTA, GIUSTI-PAIVA, VILELA, 2019; DOW *et al.*, 2019; SIMOLA, GRANON, 2018).

Outro comportamento típico em pacientes com TEA é o déficit no comportamento social, podendo ser estudado em modelos animais com sintomas semelhantes ao TEA pelo comportamento social de retorno a maravalha do ninho na infância e o comportamento social de brincar na idade pré-púbere (BAIRD, NORBURY, 2016; BATISTA, GIUSTI-PAIVA, VILELA, 2019; SUPEKAR, *et al.*, 2018).

O comportamento repetitivo e também chamado de comportamento estereotipado típico de pacientes com TEA pode ser avaliado em ratos pela quantificação de imersão com a cabeça na placa com furos. Já o comportamento restritivo pode ser observado pela exploração de objeto, onde o animal tipo autista tende a explorar mais o objeto já conhecido (BARIBEAU *et al.*, 2019; BATISTA, GIUSTI-PAIVA, VILELA, 2019; MEEKING *et al.*, 2020; SCHERTZ *et al.*, 2016; VAN'T WESTEINDE *et al.*, 2019).

Como já mencionado, os transtornos de ansiedade e depressão são comumente existentes em pacientes com TEA sendo cerca de 40% dos jovens são também acometidos com transtorno de ansiedade e de 0,9 a 29% em crianças e adolescentes com transtorno depressivo. Em roedores uma das formas de se avaliar o comportamento tipo ansioso é o teste de claro escuro, onde os animais que expressam esse comportamento permanecem mais tempo na parte escura do aparato. Para avaliar o comportamento tipo depressivo o teste mais comumente utilizado é o nado forçado, sendo que os animais que apresentam este comportamento, ficam mais imóveis no teste (ONAIVI *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2018; ROSEN, *et al.*, 2018; WHO, 2019).

Para estudar o comportamento tipo autista em roedores são utilizados os camundongos geneticamente modificados BTBR, a exposição materna ao lipopolissacarídeo, ao ácido propiónico, ao ácido valpróico, ao valproato ou ao ácido poliinosinico-policitidílico. Sabe-se também que as condições metabólicas maternas são fatores de risco conhecidos para o transtorno do espectro do autismo infantil (TEA) (BATISTA, GIUSTI-PAIVA, VILELA, 2019; CARLEZON-JR *et al.*, 2019;

CUSTÓDIO *et al.*, 2017 DOBROVOLSKY *et al.*, 2019; KIRSTEN *et al.*, 2018; PANJWANI *et al.*, 2019, MEEKING *et al.*, 2020; TARTAGLIONE, *et al.*, 2019).

A prevalência da obesidade materna vem aumentando em paralelo ao aumento da prevalência do TEA (LEI *et al.*, 2019). Estudos demonstram que a obesidade pré-gestacional materna afeta uma em cada três mulheres em idade fértil e tem sido associada à problemas na saúde e no neurodesenvolvimento da criança (FISHER *et al.*, 2013; FLEGAL *et al.*, 2016). Porém, os mecanismos subjacentes para as associações entre a obesidade e o comprometimento no neurodesenvolvimento ainda não são bem entendidos (MONTHÉ-DRÈZE, *et al.*, 2018).

O período neonatal é crítico para a programação nutricional, podendo influenciar em alterações do desenvolvimento estruturais e funcionais duradouras, pois os mecanismos fisiológicos e metabólicos não estão completamente maduros neste período (DEARDEN, OZANNE, 2015).

Filhos de mães obesas, apresentam 40% mais chances de apresentarem comprometimento emocional / comportamental e 60% mais chances de ser diagnosticado com distúrbio do desenvolvimento neurológico, além de menor desempenho cognitivo, sendo associado a uma diminuição do quociente de meio ponto de inteligência (QI) nas crianças aos 5 anos de idade em comparação aos filhos de mães com peso normal (BLIDDAL *et al.*, 2014; SANCHEZ *et al.*, 2018; WIDEN, *et al.*, 2019).

Lyll *et al.* (2011) foram os primeiros a associar a obesidade gestacional em humanos com o aumento do risco de ter filhos com TEA. Desde então surgiram muitos estudos populacionais relacionando a obesidade pré-gestacional e a obesidade gestacional com o desenvolvimento de descendentes com TEA (KONG *et al.*, 2018; KRAKOWIAK *et al.*, 2012; LEI *et al.*, 2019; PANJWANI *et al.*, 2019; VARCIN, NEWNHAM, WHITEHOUSE, 2019; WINDHAM *et al.* 2019).

Apesar da prevalência crescente, a fisiopatologia do TEA ainda não é bem entendida. Há evidências do envolvimento genético na etiologia deste transtorno, uma vez que nascidos em família com irmãos com TEA têm um risco 35-40% maior de desenvolver TEA. Além disso, alterações no desenvolvimento de estruturas neuronais e axonais, envolvendo a sinaptogênese, estão fortemente envolvidas no desenvolvimento do TEA (EISSA, *et al.* 2018). Dentre as alterações encontradas em pacientes com TEA, está a redução na expressão de sinaptofisina nas vesículas

pré-sinápticas em neurônios do hipocampo e córtex que estão relacionados com mudanças no declínio cognitivo (LI, KAVALALI, 2017).

A sinaptofisina é a glicoproteína mais abundante na membrana das vesículas pré-sinápticas. Ela está envolvida na regulação do tamanho e da duração dos eventos exocíticos, desempenhando assim um papel importante na transmissão sináptica. Estudos demonstram que a sinaptofisina não é essencial para a liberação de neurotransmissores; porém foi observado alterações comportamentais e de aprendizagem em camundongos nocaute para sinaptofisina (CAMERON *et al* 1991; LI, KAVALALI, 2017).

Diante do exposto, não existem estudos em modelos animais que comprovem a associação entre a obesidade materna e o desenvolvimento do TEA com uma possível participação da sinaptofisina nas alterações comportamentais. Assim, nosso estudo foi realizado a fim de estabelecer essas relações e desvendar alguma alteração relacionada à plasticidade sináptica que pode estar contribuindo para o TEA.

2 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde (2018) aponta que a obesidade mundial quase triplicou desde 1975, sendo nos Estados Unidos da América (USA) o país com a maior prevalência de obesos, aproximadamente 40% da população. Baseado no fato de que a obesidade materna observada em humanos está associada positivamente com descendentes diagnosticados com transtornos do espectro autista (TEA), que a prevalência de TEA em estados dos USA é quase 3 vezes superior comparada à prevalência mundial (MAENNER *et al* 2020; WHO, 2019;) e que a redução na expressão de sinaptofisina podem estar envolvidos no neurodesenvolvimento do TEA, tal estudo se torna de grande relevância. Uma vez, que até onde sabemos, não existe na literatura dados em modelos animais que façam tal relação entre a obesidade materna com o neurodesenvolvimento do TEA em seus descendentes e o possível envolvimento da sinaptofisina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o comportamento de prole tanto feminina quanto masculina e a expressão de sinaptofisina no córtex e hipocampo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterização da obesidade– (F1)

- a) Verificar se a redução de ninhada altera o ganho de peso desde o período neonatal até a vida adulta;
- b) Verificar se a redução da ninhada altera o peso das gorduras viscerais na vida adulta;
- c) Verificar se a redução da ninhada altera o índice de *Lee* em ratas adultas.

3.2.2 Ratas lactantes (F1)

- a) Avaliar o comportamento materno de ratas lactantes (F1) que foram submetidas ou não a redução do tamanho da ninhada no período pós-natal;
- b) Avaliar a atividade locomotora de ratas lactantes (F1) que foram submetidas ou não a redução do tamanho da ninhada no período pós-natal.

3.2.3 Prole – (F2)

- a) Verificar se o ganho de peso é alterado nas proles F2 de mães que foram ou não submetidas à redução da ninhada, desde o período neonatal, até a idade pré-púbere;
- b) Avaliar o número de vocalizações ultrassônicas da prole lactente;
- c) Avaliar o comportamento da prole lactente através do teste de preferência pela maravalha do ninho;

- d) Avaliar o comportamento da prole pré-púbere nos testes: comportamento social de brincar, placa com furos, reconhecimento de objetos, claro–escuro, nado forçado e campo aberto.

3.2.4 Quantificação de Sinaptofisina Western blotting – F2

- a) Avaliar a expressão de sinaptofisina do hipocampo e do córtex por Western blotting

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Antes de qualquer procedimento, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) (permit 09/2019).

Os animais foram obtidos do Biotério Central da UNIFAL. Sendo utilizadas ratas *Wistar* fêmeas de 6 a 8 semanas de vida, com peso entre 200 gramas e 250 gramas e machos da mesma linhagem com idade entre 8 a 10 semanas e pesando de 250 gramas e 300 gramas para acasalamento. Após a chegada do biotério, os animais denominados filhotes 0 (F0) ficaram por um período de ambientação por 7 dias, onde foram agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa e mantidos em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), sob regime de luz com ciclo claro–escuro de 12/12 horas (período de luz: 07h às 19h) e receberam dieta padrão e água *ad libitum* durante todo período experimental

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após ambientação no laboratório de Fisiologia Translacional, os animais F0 foram colocados para acasalar na proporção de 3 fêmeas para cada 1 macho. Na manhã do dia seguinte, foi realizado um lavado vaginal, na presença de espermatozoide em fase estral, foi considerado o dia de gestação 0 (GD0).

O dia de nascimentos dos filhotes 1 (F1) foi considerado como dia zero (PND0), sendo a padronização das ninhadas realizada no PND1. Para tal, utilizamos vinte ratas prenhes, das quais, dez tiveram suas ninhadas padronizadas em ninhada reduzida (NR), composta por 4 filhotes, sendo 2 machos e 2 fêmeas e dez, tiveram suas ninhadas padronizadas em ninhada normal (NN), sendo composta por 12 filhotes, sendo 6 machos e 6 fêmeas (SCHMIDT *et al.*, 2001).

Durante o período de lactação foi avaliado semanalmente o ganho de peso das ninhadas até o desmame, no PND21. Após o desmame somente as fêmeas provenientes de NR e NN, foram mantidas no biotério, agrupadas em 4 animais por

caixa e pesadas semanalmente até atingirem a idade adulta PND56. Os machos foram sacrificados por excesso de anestésico inalatório Isoflurano.

No PND56 essas ratas foram utilizadas para caracterização da obesidade ou colocadas para acasalar com machos experientes (provenientes do biotério central) conforme descrito anteriormente; o CM avaliado nessas mães do PND2-8.

Filhotes nascidos de mães criados em ninhada normal ou ninhada reduzida foram considerados filhotes 2 F2 e submetidos aos testes comportamentais durante a lactação (PND5 e PND13) e idade pré-púbere (PND28-32). Além disso, o peso desses animais foi acompanhado semanalmente.

É importante salientar que para a obtenção dos filhotes provenientes de mães NN ou NR, foi utilizada somente uma fêmea de cada ninhada reduzida ou normal, para exclusão do efeito ninhada (LAZIC, ESSIUX, 2013; PLAGEMANN *et al.*, 1998; VERONESI *ET AL.*, 2017) e cada animal passou por apenas um teste.

Assim, os grupos experimentais foram os seguintes:

Acompanhamento de peso desde o nascimento até e vida adulta de ratas dos grupos NN-F1 e NR-F1

- fêmeas adultas criadas em ninhada reduzida (n=8);
- fêmeas adultas criadas em ninhada normal (n=8).

Análise do índice de Lee e peso do tecido adiposo: retroperitoneal e perigonadal das ratas vida adulta dos grupos NR-F1 e NN-F1

- fêmeas adultas criadas em ninhada reduzida (n=8);
- fêmeas adultas criadas em ninhada normal (n=8).

Análises comportamentais das mães NR-F1 e NN-F1

Comportamento materno (PND2-8)

- mães criadas em ninhada reduzida (n=8);
- mães criadas em ninhada normal (n=8).

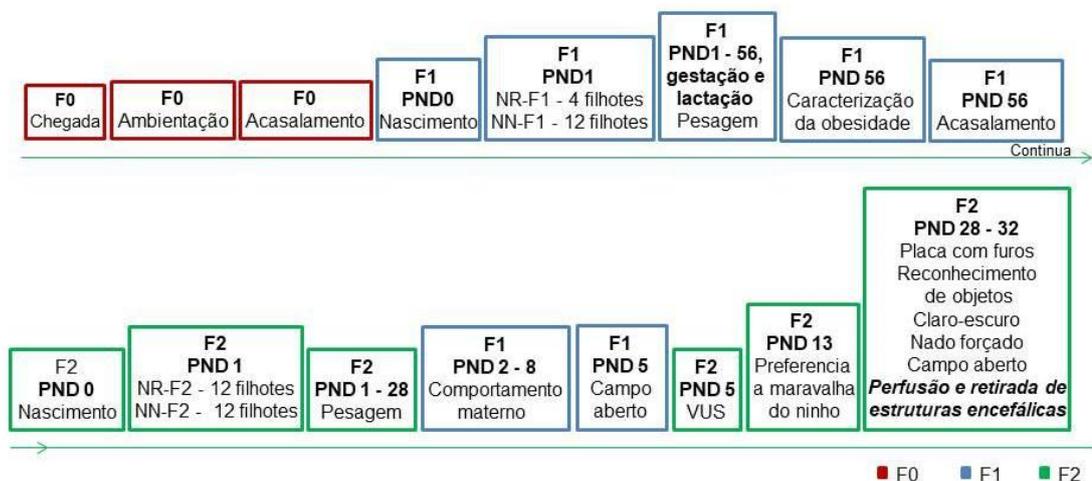
Análises da VUS e comportamentais das proles NR-F2 e NN-F2

Vocalização ultrassônica (PND5), preferência pela maravalha do ninho (PND13), comportamento social de brincar (PND28-32), placa com furos (PND28-32), reconhecimento de objetos (PND28-32) e claro-escuro (PND28-32), nado forçado (PND28-32) e campo aberto (PND28-32)

- filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=8);
- filhotes fêmeas provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=8);
- filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=8);
- filhotes fêmeas provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=8).

Após o final dos testes experimentais, metade dos animais foram sacrificados por excesso de anestésico inalatório Isoflurano e decapitados para retiradas das estruturas encefálicas hipocampo e córtex. O restante dos animais foram sedados e perfundidos para posteriores procedimentos.

Quadro 1 - Representação esquemática do delineamento experimental



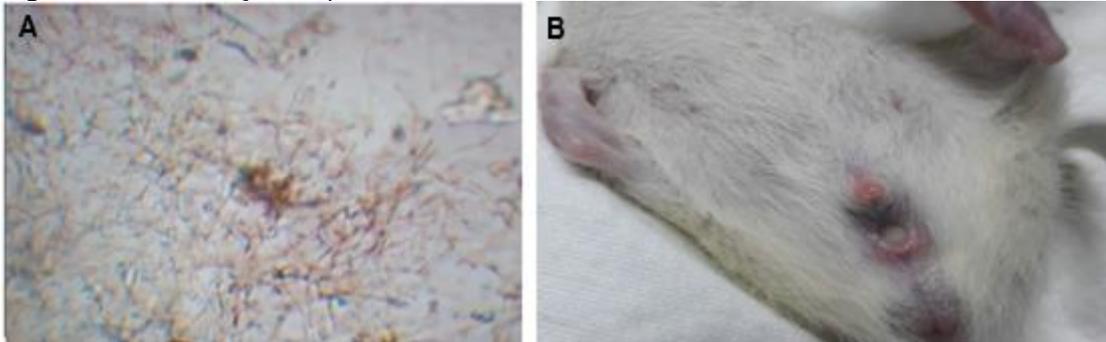
Fonte: Da autora

4.3 ACASALAMENTO – F0

Após o término do período de ambientação as ratas foram pesadas e transferidas para caixas com ratos sexualmente experientes, na proporção de três fêmeas para cada macho. Na manhã do dia seguinte foi feito um lavado vaginal e o dia que for encontrado espermatozoide foi considerado o dia de gestação 0 (GD0) e as ratas prenhas foram separadas a cada 3 por caixa até o 15º dia de gestação,

onde foram separadas individualmente, o dia do parto foi designado como o dia pós natal 0 (PND0).

Figura 1 – Confirmação de prenhez



Fonte: Da autora

Nota: A imagem (A) mostra a presença de espermatozoides no lavado vaginal em fase estral e a imagem (B) mostra a presença de tampão vaginal caracterizando o início da gestação.

4.4 INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE – F1

4.4.1 Redução do tamanho da ninhada – F1

Após o nascimento os filhotes de mães provindas do biotério foram considerados filhos 1 (F1) e padronizados no PND1 com 4 filhotes para a ninhada reduzida (NR-F1) na proporção de 2 machos e 2 fêmeas para cada mãe e a ninhada normal (NN-F1) foram padronizada com 12 filhotes por mãe, sendo a proporção de 6 machos e 6 fêmeas por ninhada.

Figura 2 – Ninhada Normal e Ninhada Reduzida



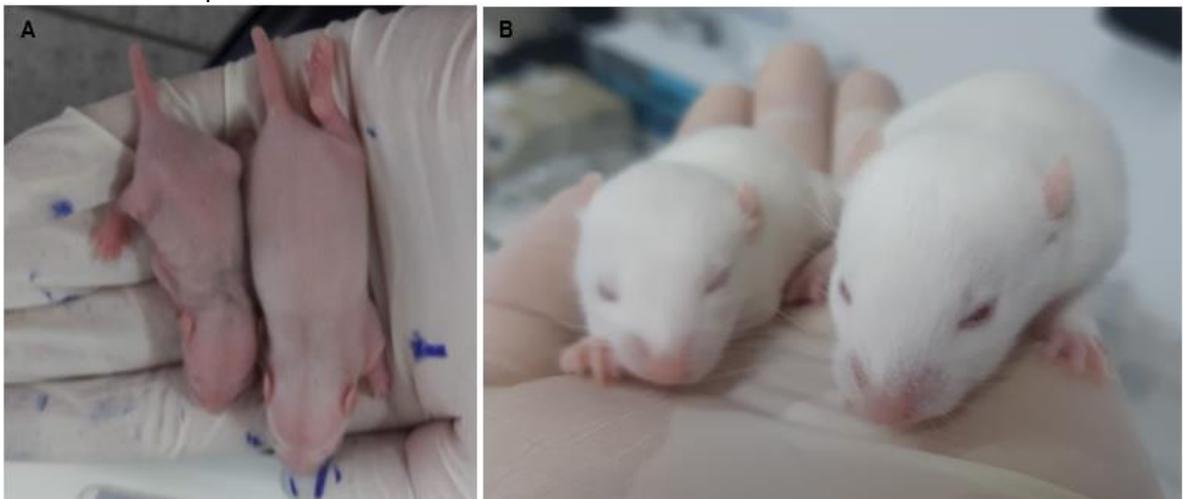
Fonte: Da autora

Nota: A figura mostra a diferença dos animais entre os grupos, ninhada normal (NN-F1) e ninhada reduzida (NR-F1) no PND-15

4.4.2 Acompanhamento do ganho de peso - F1

Ninhadas dos grupos NN-F1 e NR-F1 foram pesados semanalmente desde 1º dia pós nascimento (PND1) até o desmame no PND21 e após esse período o experimento foi continuado apenas com as fêmeas, onde a pesagem foi feita de forma individual até o último dia lactacional na vida adulta.

Figura 3- Diferença de tamanho entre fêmeas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida no período neonatal



Fonte: Da autora

Nota: Imagem (A) PND8 e imagem (B) PND15.

4.4.3 Índice de Lee e peso do tecido adiposo – F1

Fêmeas adultas dos grupos NN-F1 e NR-F1 na idade de acasalamento (PND56) foram sacrificadas com excesso de anestésico inalatório isofurano, foi avaliado o Índice de Lee [peso corporal (g) 1 = 3 / comprimento nasoanal (cm) 100] (SANCHES et al, 2016) e as gorduras retroperitoneal e perigonadal extraídas e pesadas.

4.5 AVALIAÇÕES DAS RATAS LACTANTES - F1

4.5.1 Comportamento Materno – F1

O comportamento materno das ratas F1 lactantes foi avaliado do PND2 ao PND8, sendo observado 1 vez a cada 3min, 3h/dia em dois períodos, das 7h30min às 9h e das 15h30min às 17h. (adaptado de VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

Os seguintes parâmetros comportamentais foram observados:

- Número de vezes que a rata fica sem filhotes: quando a rata estiver fora do ninho, explorando, alimentando-se, sem contato físico com os filhotes;
- Número de vezes que a rata fica lambendo filhotes;
- Número de vezes que a rata fica sobre os filhotes em posição não arqueada;
- Número de vezes que a rata fica sobre os filhotes em posição arqueada (cifose);
- Número de vezes que a rata fica em posição passiva: deitada de costas ou de lado;
- Número de vezes que a rata fica construindo o ninho: quando a rata pega o filhote pela boca ou empurra-o para o ninho
- Número de vezes que a rata fica limpando-se

Figura 4- Alguns dos comportamentos maternos observados



Fonte: Da autora

Nota: Cifose (A), Lambendo os filhotes (B) e construindo o ninho (C).

4.5.2 Campo aberto – F1

O campo aberto é útil para análise da atividade locomotora do animal, pois permite quantificar a atividade motora espontânea. O aparato de campo aberto consiste de uma arena circular de acrílico, com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura com o piso preto. O teste foi realizado com as ratas lactantes F1 no quinto dia de lactação. As ratas foram colocadas no centro da arena e a sua atividade de locomotora filmada por 5 minutos para avaliação da distância percorrida (BATISTA, GUISTI-PAIVA, VILELA, 2019). Após cada teste, o campo aberto foi limpo com álcool 5%. A análise foi realizada automaticamente dos vídeos obtidos por filmagem de cada experimento

4.6 PADRONIZAÇÕES PARA TESTES COMPORTAMENTAIS – F2

Filhotes de F1 foram padronizados no PND1 com 12 filhotes por mãe, sendo a proporção de 6 machos e 6 fêmeas por ninhada.

4.7 AVALIAÇÃO DA PROLE - F2

4.7.1 Acompanhamento do ganho de peso - F2

Ninhadas dos grupos NN-F1 e NR-F1, foram considerados filhos 2, NN-F2 e NR-F2 respectivamente e foram pesados semanalmente desde PND1 até o desmame no PND21 e individualmente no PND28.

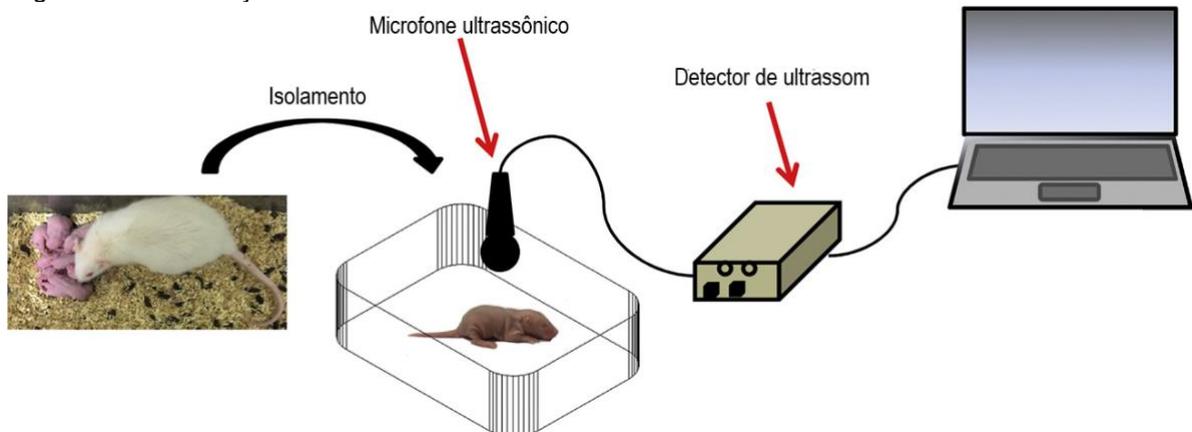
4.7.2 Índice de Lee e peso do tecido adiposo – F2

Filhotes machos e fêmeas na idade pré-púbere (PND32) dos grupos NN-F2 e NR-F2 foram sacrificadas com excesso de anestésico inalatório isofurano, foi avaliado o Índice de Lee [peso corporal (g) $1 = 3$ / comprimento nasoanal (cm) 100] (SANCHES *et al*, 2016) e as gorduras retroperitoneal, epididimal e perigonadal extraídas e pesadas.

4.7.3 Vocalização Ultrassônica (VUS) – F2

A quantificação das vocalizações ultrassônicas são importantes para avaliar a comunicação social precoce (BATISTA, GUISTI-PAIVA, VILELA, 2019). No PND5, um filhote macho e uma 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 3 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 foram cuidadosamente limpo com uma solução de 5% de álcool após cada teste.

Figura 5 – Vocalização ultrassônica

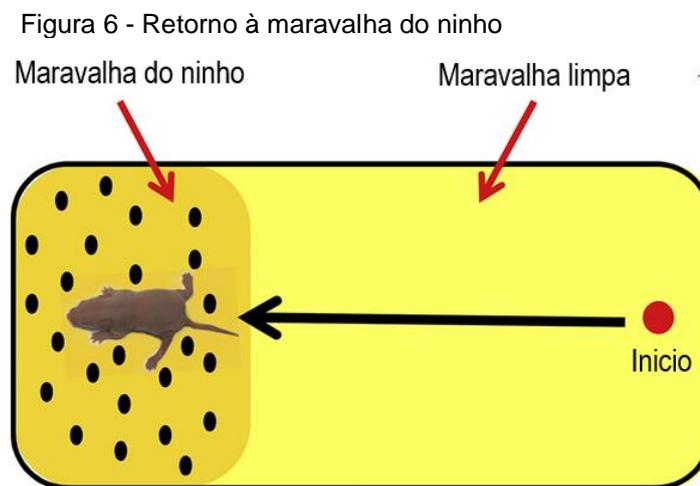


Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018.

4.7.4 Comportamento de preferéncia pela maravalha do ninho – F2

O comportamento de preferéncia pela maravalha do ninho é utilizado para avaliar a discriminação olfatória (BATISTA, GUISTI-PAIVA, VILELA, 2019). No PND13, um filhote macho e uma 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 3/4 com maravalha limpa e 1/4 com maravalha da mãe. O filhote foi posicionado no lado da caixa que estava coberta por maravalha limpa, com o focinho voltado para a parede da caixa e seu comportamento foi analisado por 3 minutos em tempo real. Os seguintes parâmetros foram registados: 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.*, 2018).



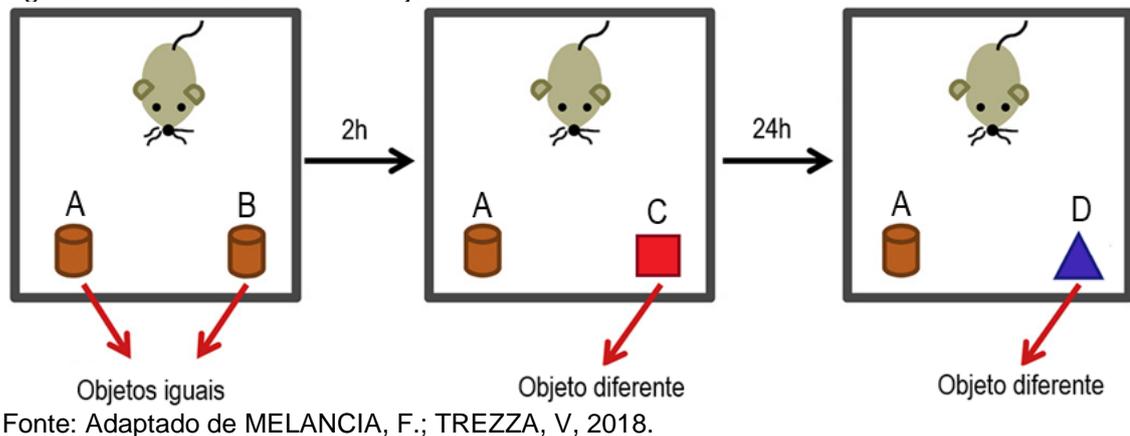
Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V., 2018.

4.7.5 Reconhecimento de objetos – F2

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 (REGER; 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 PND28-32 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, o objeto de treinamento B (objeto familiar) foi substituído por um novo objeto C (objeto novo) e 24 horas após, o objeto C foi substituído por um novo objeto D (objeto novo) conforme podemos observar na figura 7. 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 (IR) 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 em 2h (C) e 24h (D) (ANDERSON *et al.*, 2004; MELANCIA, *et al.*, 2017; RECH *et al.*, 2010;). Entre os testes, os objetos e a arena foram devidamente limpos.

Figura 7 – Reconhecimento de objetos

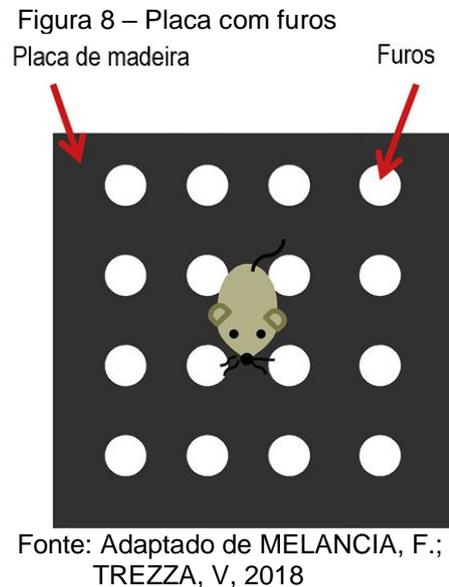


4.7.6 Placa com furos – F2

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

O aparato da placa com furos consiste em uma arena quadrada (40 cm x 40 cm) com fundo preto e 16 furos com três cm de diâmetro cada (figura 8). Os animais foram ambientados ao aparato sem a placa com furos no dia anterior ao teste, entre os dias PND28-32, 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 encobrir os olhos) nos orifícios da placa

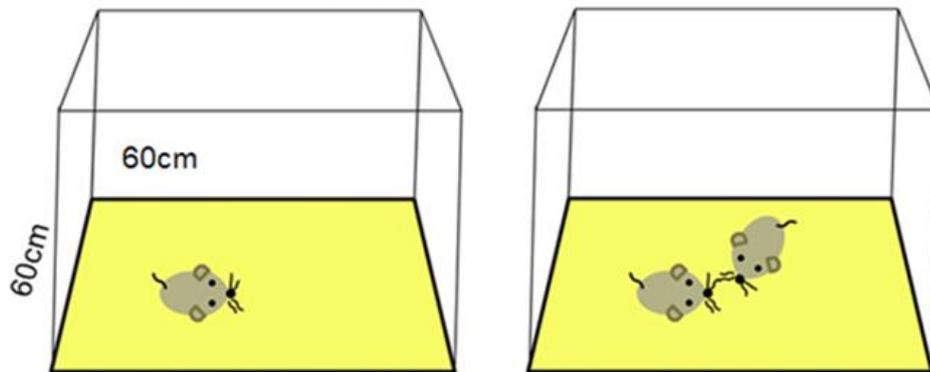
(SERVADIO *et al.*, 2016). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5 %.



4.7.7 Comportamento social de brincar

O teste de comportamento social de brincar é utilizado para avaliar o interesse em brincar socialmente. O comportamento 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 2 dias antes do experimento. No dia do teste (PND 28-32), os animais foram isolados por 3h30min antes do teste para aumentar sua motivação social e assim facilitar a expressão do comportamento pré-púbere de brincadeira (TREZZA, BAARENDSE, VANDERSCHUREN, 2009; TREZZA, VANDERSCHUREN, 2008;). O teste consistiu em colocar dois animais pertencentes ao mesmo grupo experimental não irmãos na arena de teste durante 10 minutos e as interações do comportamento pré-púbere de brincadeira foram então registradas para posterior análise. Foi registrado o tempo em segundos em que cada animal interagia com o outro animal. Com o objetivo de reduzir as interferências nas respostas comportamentais, os animais em pares não diferiram mais de 10 g no peso corporal (MELANCIA *et al.*, 2018).

Figura 9- Comportamento pré-púbere de brincadeira

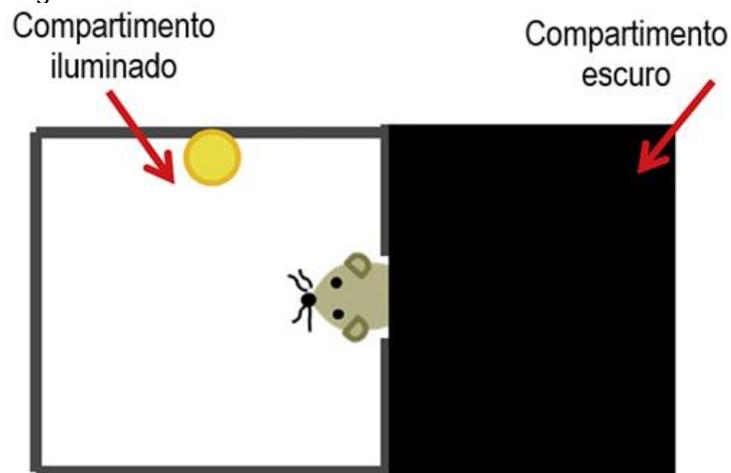


Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018

4.7.8 Claro – Escuro

A avaliação do comportamento no aparato de claro-escuro é utilizado para avaliar comportamento tipo-ansioso. O aparato que foi utilizado para realização do teste é uma caixa dividida em dois compartimentos: um com paredes pretas e tampa escura; e um com paredes brancas e iluminação ambiente. Estes compartimentos são separados por uma divisória do “tipo guilhotina”, com uma porta central de 7,5 x 7,5 cm, ao nível do chão. Cada rato foi alocado individualmente no centro da parte iluminada, de frente para a abertura que leva ao lado escuro da caixa, sendo-lhe permitido explorar livremente os dois compartimentos durante 5 minutos. Foi avaliado o tempo de latência para atingir o compartimento escuro e tempo de permanência no lado escuro (DOUKKALI *et al.*, 2015). Após a exposição de cada animal ao experimento, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 10 – Claro-Escuro



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

4.7.9 Nado Forçado

A avaliação do tempo de imobilidade no teste de nado forçado é utilizado para avaliar comportamento tipo-depressivo em roedores. Um dia antes da realização do teste de nado forçado os animais 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 e tempo (s) de imobilidade. Após o experimento com cada animal a água foi trocada para evitar a influência de substâncias de alarme (ABEL, BILITZKE, 1990).

Figura 11 – Nado Forçado



Fonte: Da autora

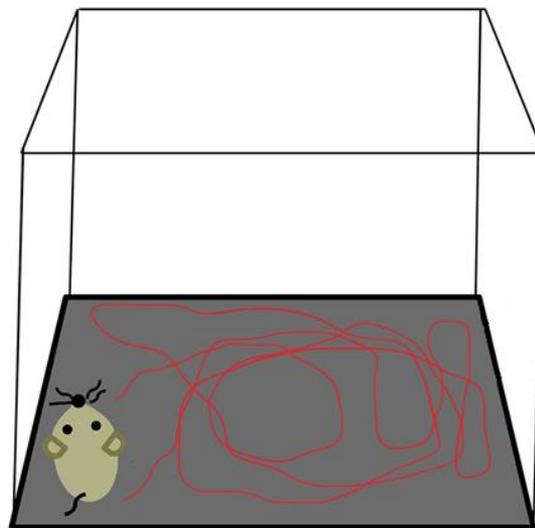
Nota: Comportamento imóvel

4.7.10 Campo aberto

O campo aberto é útil para análise da atividade locomotora do animal, pois permite quantificar a atividade motora espontânea. O aparato de campo aberto

consiste de uma arena quadrada de acrílico, com 60 cm de largura, 60 cm de comprimento e paredes com 50 cm de altura, com o piso preto. O teste foi realizado com os filhotes F2 entre os dias PND28-32. Os animais foram colocados no centro da arena e a sua atividade locomotora filmada por vinte minutos. A avaliação da distância percorrida foi realizada automaticamente (BATISTA, GUISTI-PAIVA, VILELA, 2019). Após cada teste, o campo aberto foi limpo com álcool 5%. A análise foi realizada por meio da observação dos vídeos obtidos por filmagem de cada experimento.

Figura 12 – Campo Aberto



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

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE SINAPTOFISINA POR WESTERN BLOTTING - F2

Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados e o hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados e armazenado em -80°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°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 10% ou 12% dependendo o peso das proteínas (electroforese em gel de poliacrilamida com

dodecilsulfato de sódio) e em seguida foram 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 e albumina em PBS durante 3 horas a temperatura ambiente e depois incubada overnight, a 4 °C com determinado anticorpo primário Anti-Sinaptofisina (1:1000, Abcam, ab8049). No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS contendo 0,05% de Tween 20, as membranas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário Anti-Rabbit (1:4000, Santa Cruz). Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05% e depois foi utilizado um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de detecção 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 passarão pelo processo de stripping seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 horas. 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 ° 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 hora com o anticorpo secundário (1:2000, Abcam-ab 6789). Após incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, em seguida foi utilizado o mesmo kit de detecção durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de detecção 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 das bandas foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad. A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da β -actina e os dados foram expressos normalizados para o controle (RIBEIRO et al., 2020).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando um *software GraphPad* versão 8.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação de dois grupos foi aplicado o teste “*t*” de *Student*. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE DE RATAS F1

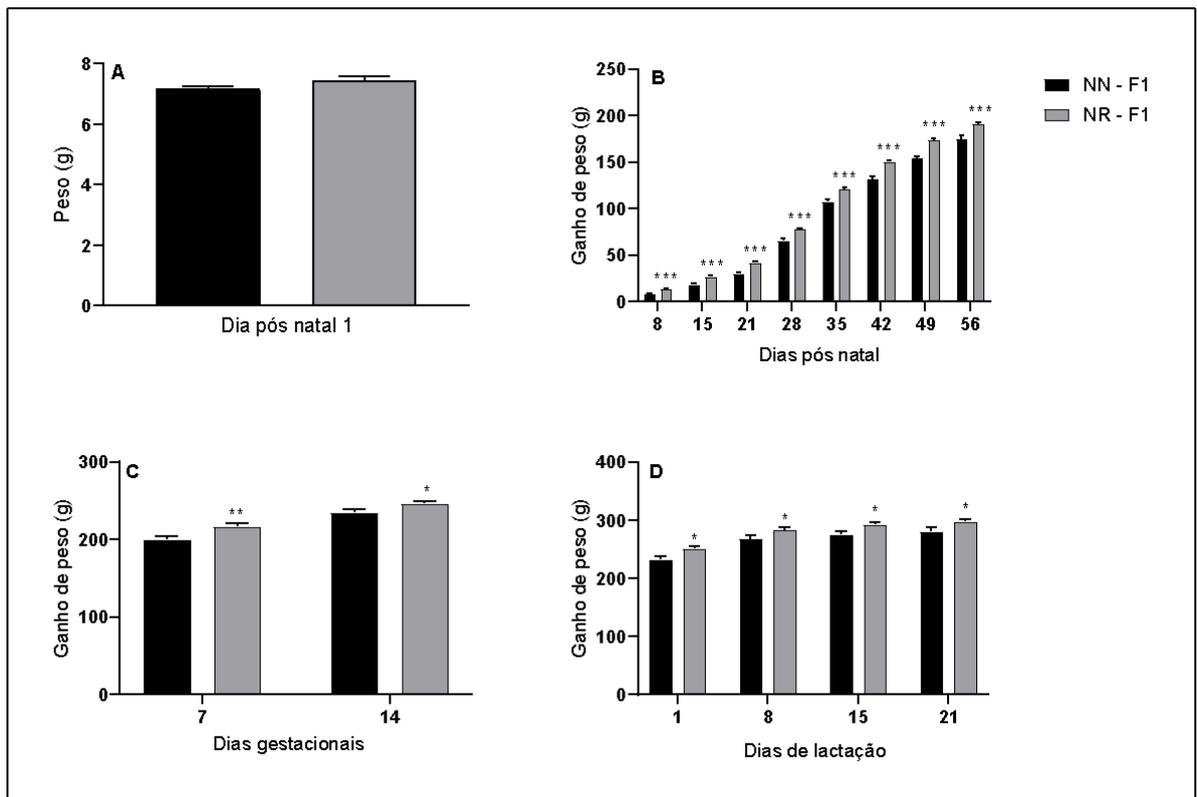
Para caracterização da obesidade avaliamos o ganho de peso do período neonatal até a vida adulta (PND8 – 56), e avaliamos no PND56 o índice de *Lee* e peso do tecido adiposo.

6.1.1 Avaliação do peso das ratas F1

A figura 13 mostra o peso após o nascimento no PND1 (A) e ganho de peso do período neonatal PND8 até a fase adulta PND56 (B), ganho de peso durante a gestação (C) e ganho de peso durante a lactação (D) das ratas F1 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A análise através do teste *t Student* demonstrou que os animais do grupo ninhada reduzida apresentaram um aumento no ganho de peso desde o PND8 ($p < 0,001$) mantendo essa diferença até o PND56 ($p < 0,001$); foi demonstrado também que houve aumento no ganho de peso destes animais na fase gestacional GD7 ($p < 0,01$) e GD14 ($p < 0,5$) e de amamentação ($p < 0,5$) quando comparado ao grupo ninhada normal.

Figura 13: Efeito da redução do tamanho da ninhada no ganho de peso do grupo F1



Fonte: Da autora

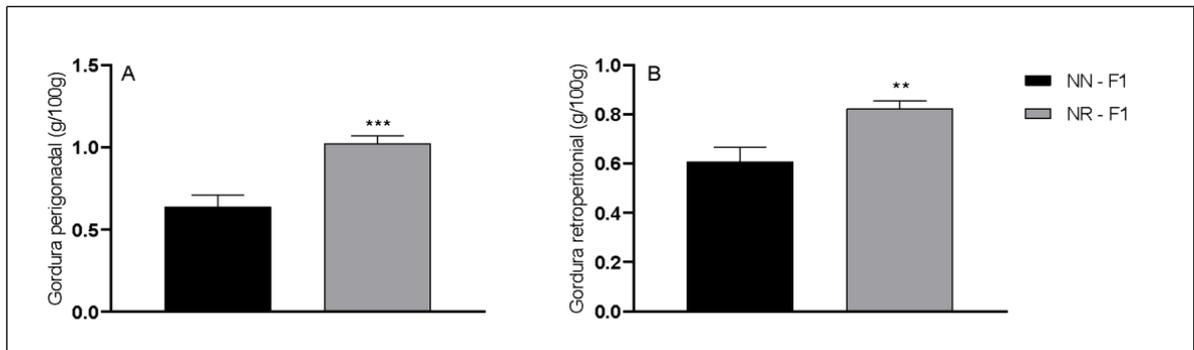
Nota: N= 8 animais por grupo. A) Peso ao nascer, B) ganho de peso do período neonatal até a idade de acasalamento na vida adulta, C) ganho de peso durante a gestação, D) Ganho de peso durante a lactação, NN-F1: criadas em ninhada normal e NR-F1: criadas em ninhada reduzida. Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com controle (NN-F1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.1.2 Peso do tecido adiposo de ratas adultas – F1

A figura 14 mostra o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitonal (B) no PND56 das ratas F1 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A análise através do teste *t Student* demonstrou que os animais do grupo ninhada reduzida apresentaram um aumento da gordura perigonadal (A) ($p < 0,001$), e da gordura retroperitonal (B) ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo ninhada normal.

Figura 14: Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre a adiposidade ratas adultas (PND56) do grupo F1



Fonte: Da autora

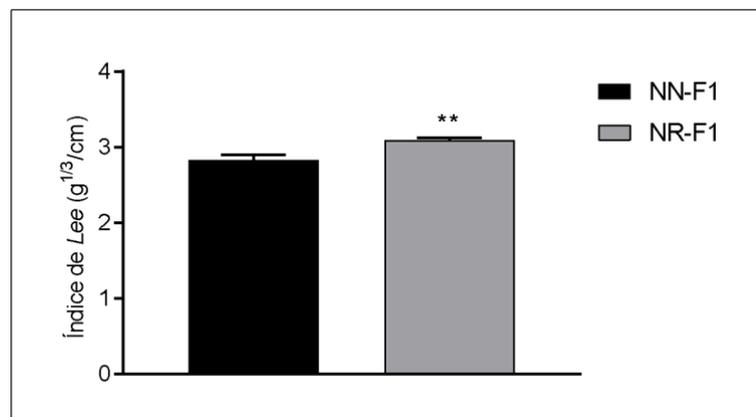
Nota: N= 8 animais por grupo. Peso das gorduras A) perigonadal, B) retroperitoneal Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com controle(NN-F1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.1.3 Avaliação do Índice de Lee de ratas adultas – F1

A figura 15 mostra a avaliação do índice de Lee no PND56 das ratas F1 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A análise através do teste *t Student* demonstrou que os animais do grupo ninhada reduzida apresentaram um aumento no índice de Lee ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo ninhada normal.

Figura 15: Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o índice de Lee de ratas adultas (PND56) do grupo F1



Fonte: Da autora

Nota: N= 8 animais por grupo. Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0.01$ comparado com controle(NN-

F1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.2 AVALIAÇÕES DAS RATAS LACTANTES - F1

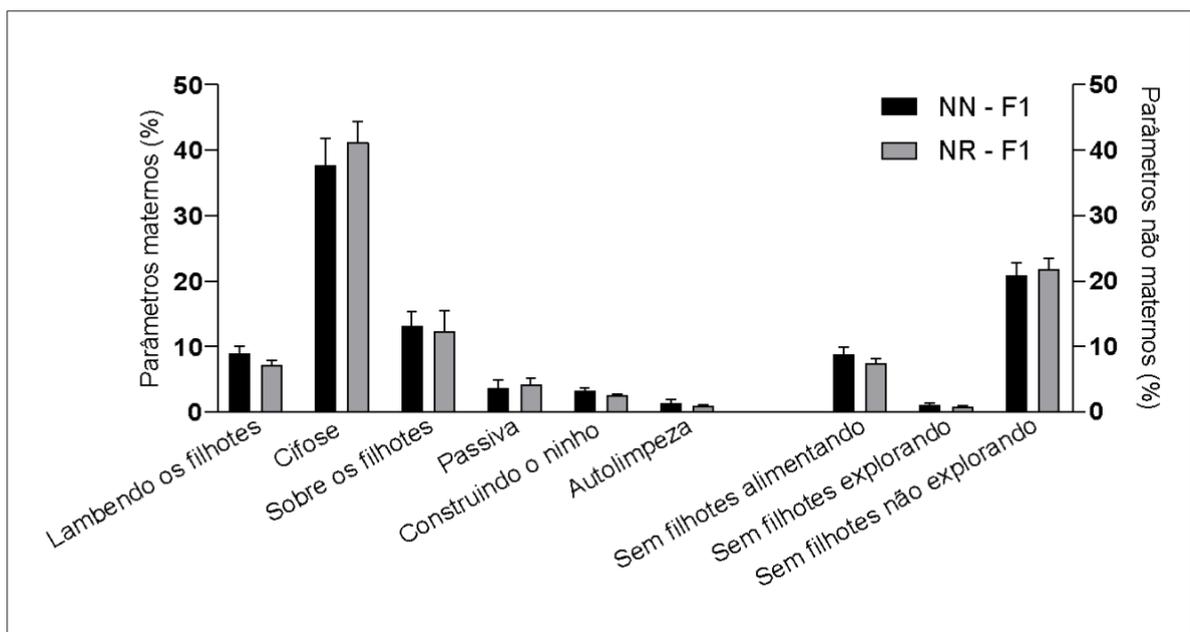
As ratas do grupo F1 que foram colocadas para acasalar para gerar F2, foram avaliadas durante o período de lactação.

6.2.1 Avaliação do comportamento materno – F1

A figura 16 mostra a avaliação da porcentagem do comportamento materno de ratas do grupo ninhada normal (NN-F1) e ninhada reduzida (NR-F1) do 2º ao 8º dia de lactação.

Observa-se que não houve diferença entre os grupos experimentais nos parâmetros avaliados.

Figura 16 – Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada no comportamento materno e não materno do grupo F1



Fonte: Da autora.

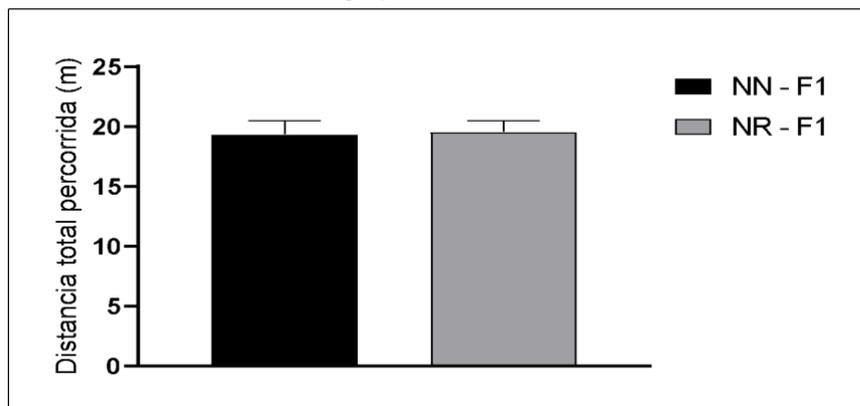
Nota: N=8 animais por grupo. Avaliação da porcentagem do comportamento materno de lambida, cifo, sobre os filhotes, passiva, construção do ninho e lambendo-se e do comportamento não materno de alimentação, exploração e não exploração das ratas lactantes do grupo NN-F1: criadas em ninhada normal e NR-F1: criadas em ninhada reduzida. Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.2.2 Avaliação campo aberto – F1

A figura 17 mostra a avaliação da distancia percorrida de ratas do grupo ninhada normal (NN-F1) e ninhada reduzida (NR-F1) no campo aberto.

Observa-se que não houve diferença entre os grupos analisados.

Figura 17: Efeito da redução do tamanho da ninhada na atividade locomotora do grupo F1



Fonte: Da autora

Nota: N= 8 animais por grupo. Distancia percorrida no campo aberto, NN-F1: criadas em ninhada normal e NR-F1: criadas em ninhada reduzida. Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3 AVALIAÇÃO DOS FILHOTES - F2

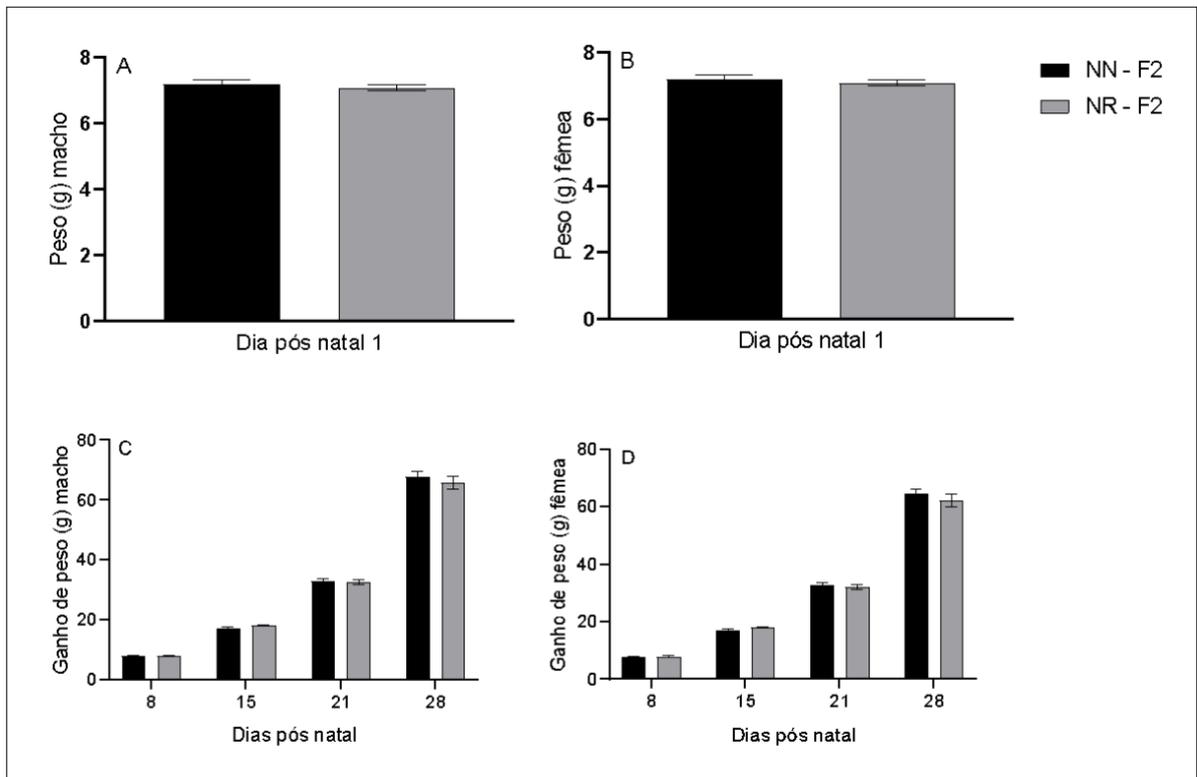
Os filhotes F2 filhos de mães NN e NR (F1), foram avaliados durante o período de lactação até a idade pré-púbere (PND28-32).

6.3.1 Avaliação do ganho de peso - F2

Figura 18 mostra o peso (A) e ganho de peso de machos (B) e fêmeo (C) de filhotes F2 provindo de ratas dos grupos ninhada normal (NN-F1) ou ninhada reduzida (NR-F2).

Observa-se que não houve diferença de peso e de ganho de peso entre os grupos filhos de mães NN e mães NR.

Figura 18: Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o ganho de peso de seus descendentes.



Fonte: Da autora

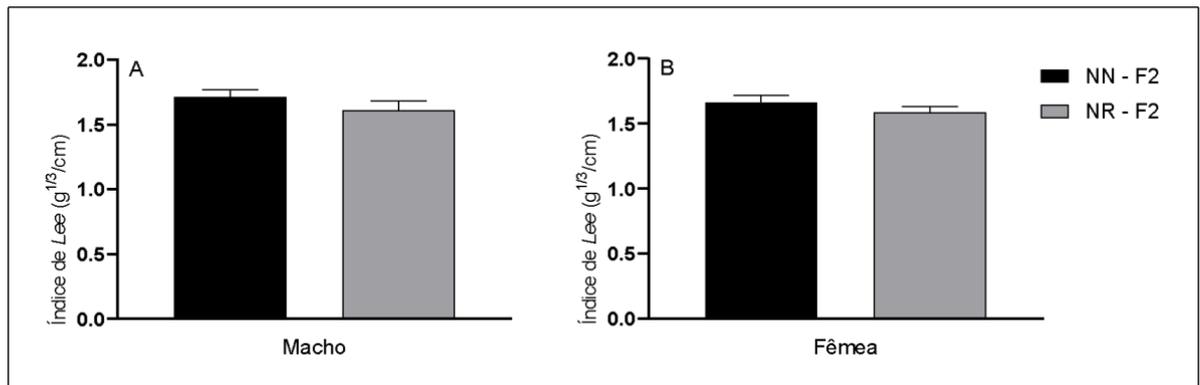
Nota: N= 8 animais por grupo. A) Peso ao nascer e acompanhamento de ganho de peso de filhos machos e C) fêmeas, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.2 Avaliação do Índice de Lee filhotes - F2

A figura 19 mostra a avaliação do índice de *Lee* no PND56 das ratas F2 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A análise através do teste *t Student* não demonstrou diferenças entre os grupos.

Figura 19: Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o Índice de Lee de seus descendentes.



Fonte: Da autora

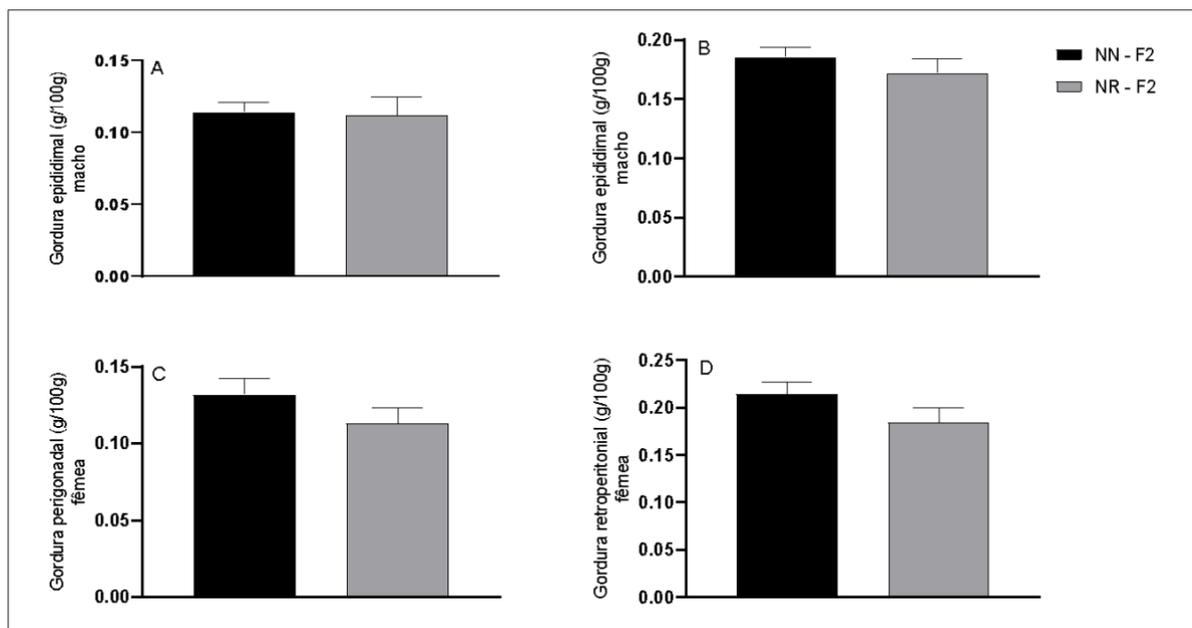
Nota: N= 8 animais por grupo. NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.3 Peso do tecido adiposo - F2

A figura 20 mostra o peso das gorduras dos machos epididimal (A), retroperitoneal (B) e das fêmeas perigonadal (C) e retroperitoneal (D) no PND28 de filhotes F2 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A análise através do teste *t Student* demonstrou que não houve diferenças das quantidades de gorduras entre os grupos

Figura 20: Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a adiposidade de seus descendentes.



Fonte: Da autora

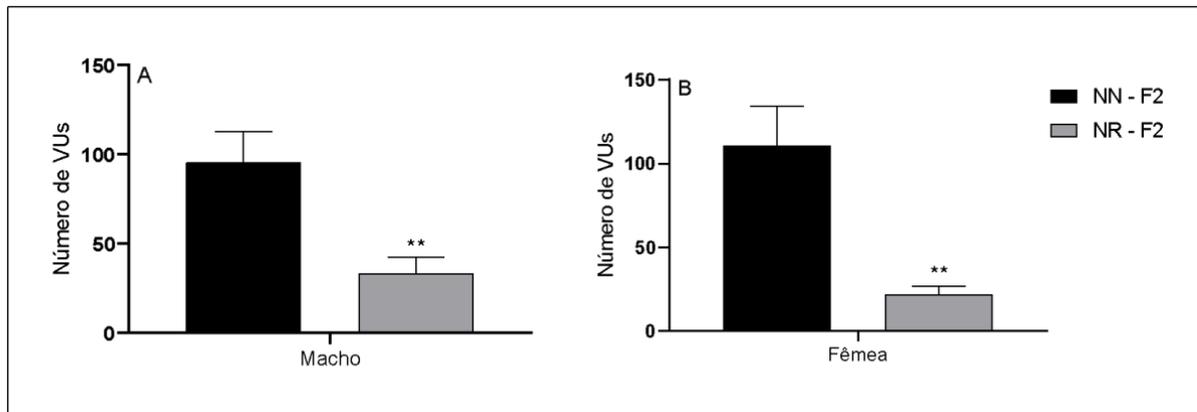
Nota: N= 8 animais por grupo. Peso das gorduras A) epididimal, B) retroperitoneal de filhotes machos, peso das gorduras C) perigonadal, D) retroperitoneal de filhotes fêmeas, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média ± EPM.

6.3.3 Vocalização Ultrassônica (VUS) – F2

A Figura 21 mostra a quantificação de vocalizações ultrassônicas dos filhotes F2 machos (A) e fêmeas (B) provindos de ratas dos grupos ninhada normal ou ninhada reduzida.

A análise através do teste *t Student* demonstrou que os animais F2 provenientes de mães do grupo ninhada reduzidas, apresentaram uma redução no número de vocalizações ultrassônicas (macho $p < 0.01$; fêmea $p < 0.01$) quando comparados ao controle.

Figura 21 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a vocalização ultrassônica de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

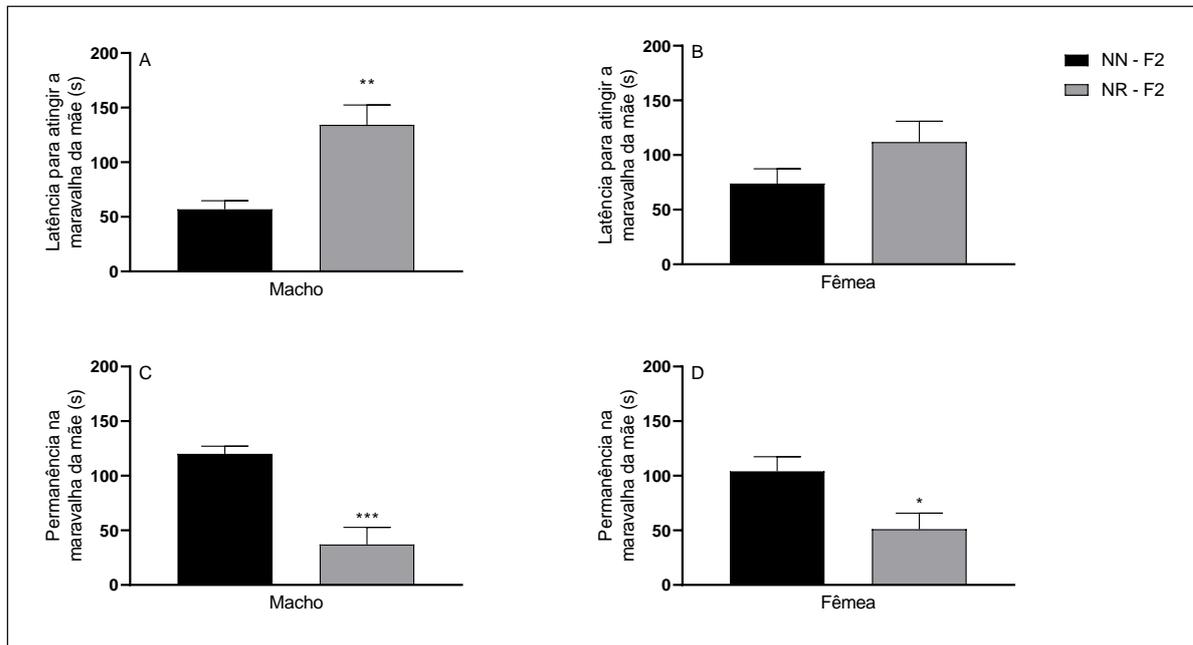
Nota: N= 8 animais por grupo. Número de vocalizações ultrassônicas de filhos A) machos e B) fêmeas, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0.01$ comparado com controle (NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.4 Comportamento de retorno para o ninho – F2

A figura 22 mostra a avaliação do teste de comportamento de retorno para o ninho dos filhotes (F2 – macho e fêmea) provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Observa-se no gráfico A que houve um aumento no tempo de latência dos machos ($p < 0.01$) provindos de mãe do grupo ninhada reduzida para atingir a maravalha da mãe. No gráfico B não foi observado diferença, já nos gráficos C e D pode-se observar uma redução no tempo de permanência na maravalha do ninho de machos ($p < 0.001$) e fêmeas ($p < 0.5$) provindos de mães do grupo ninhada reduzida quando comparados aos filhotes das ratas do grupo ninhada normal.

Figura 22 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de retorno a maravalha do ninho de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

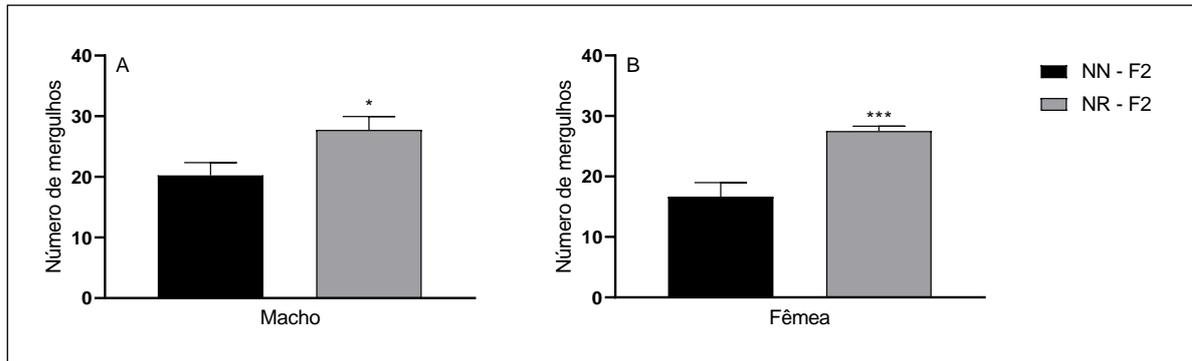
Nota: N=8 animais por grupo. – Latência para atingir a maravalha do ninho de filhotes A) machos e B) fêmeas, tempo de permanência na maravalha do ninho dos filhotes C) machos e D) fêmeas, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.5 Placa com furos – F2

A figura 23 mostra o número de mergulhos com a cabeça nos furos do aparato de filhotes machos (A) e fêmeas (B) provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Os gráficos A e B demonstram que houve um aumento no número de mergulhos tanto nos machos ($p < 0.5$) quanto nas fêmeas ($p < 0.001$) provindos de mães do grupo ninhada reduzida quando comparados aos filhotes das ratas do grupo ninhada normal.

Figura 23 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de placa com furos de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

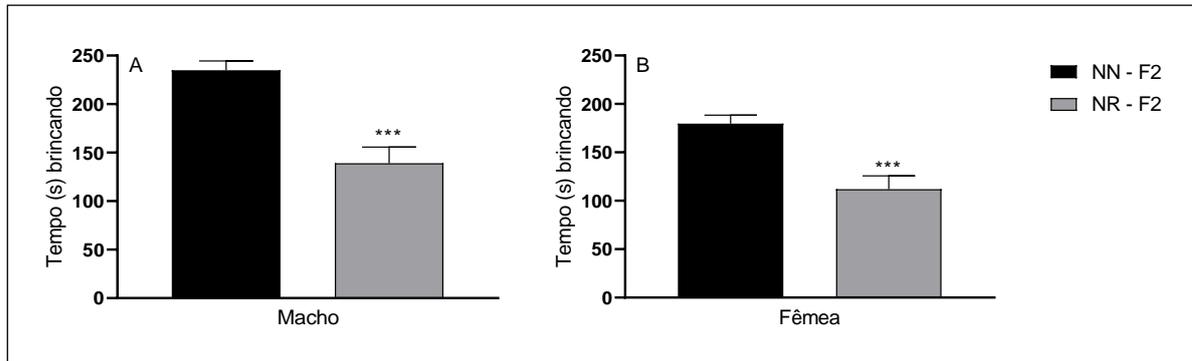
Nota: N=8 animais por grupo. Número de mergulhos com a cabeça de filhotes A) macho e B) fêmea, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0.5$ e ** $p < 0.001$ comparado com controle (NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.2.6 Comportamento social de brincar – F2

A figura 24 demonstra a avaliação do tempo total do comportamento social de brincar de filhote F2 macho (A) e fêmea (B) provinda de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Podemos observar que houve uma redução no tempo de brincadeira dos animais provenientes de ratas do grupo ninhada reduzida (machos $p < 0.001$ e fêmeas $p < 0.001$) quando comparados ao controle.

Figura 24 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de brincadeira de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

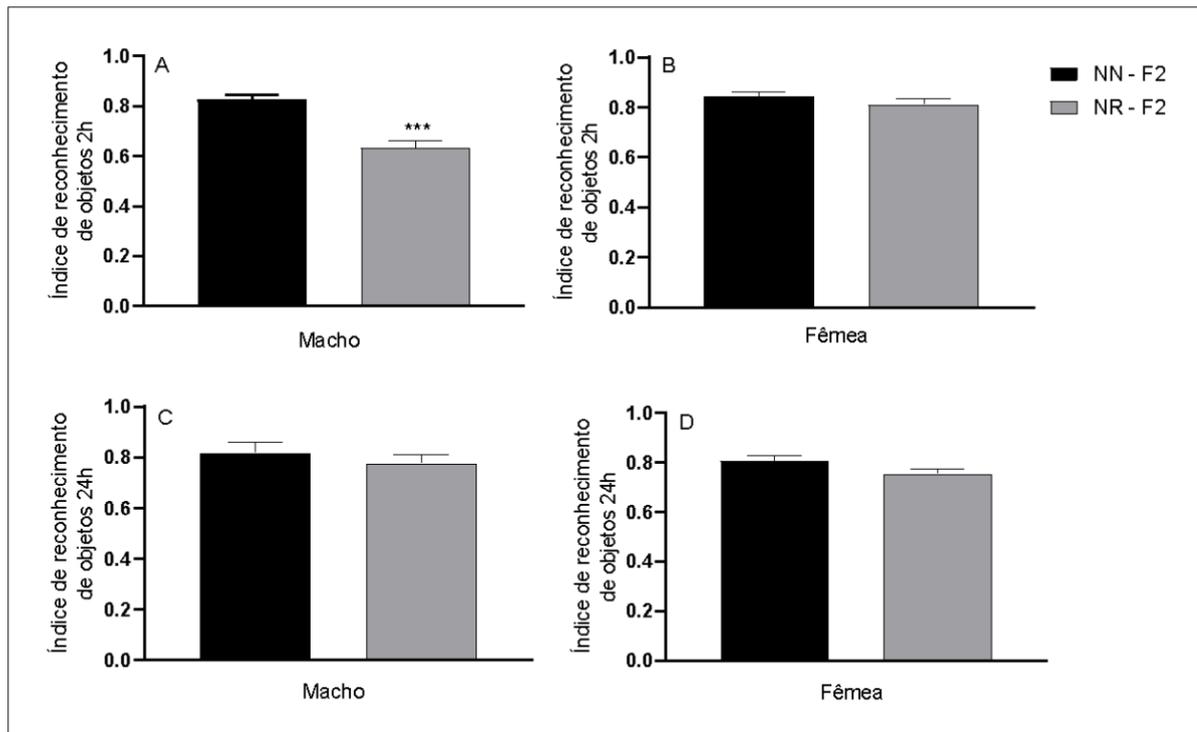
Nota: N=8 animais por grupo. Comportamento social de brincar de filhotes A) machos e B) fêmeas NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1(ninhada reduzida). Os símbolos representam o nível de significância *** $p < 0.001$ comparado com controle(NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.7 Reconhecimento de objetos

A figura 25 mostra o índice de reconhecimento de objetos de 2h dos animais machos (A) e fêmea (B) e de 24h dos animais machos (C) e fêmeas (D) provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Como podemos observar no gráfico A, houve uma redução no índice de reconhecimento de objetos de 2h dos machos ($p < 0.001$) provindos de mãe do grupo ninhada reduzida quando comparados aos filhotes das ratas do grupo ninhada normal, não observamos diferenças nos gráficos B, C e D quando comparados ao seu controle.

Figura 25 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance de reconhecimento de objetos de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

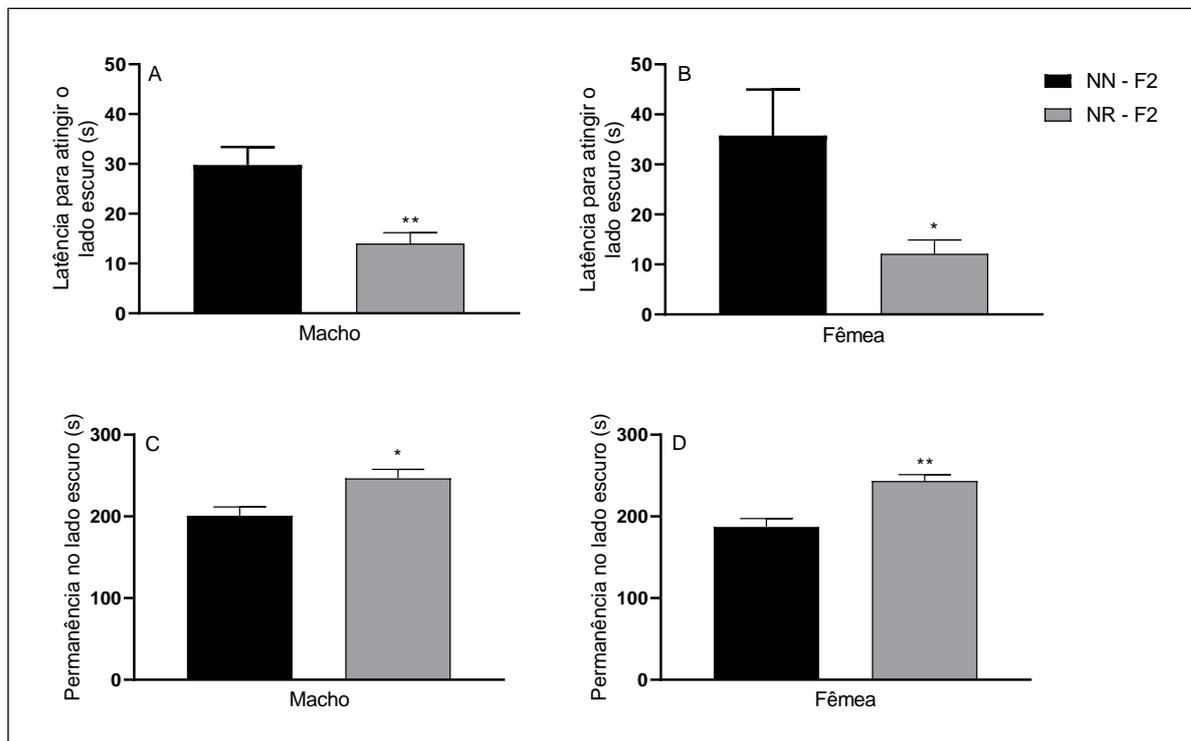
Nota: N=8 animais por grupo. Índice de reconhecimento de objetos de 2h de filhotes A) machos e B) fêmeas, índice de reconhecimento de objetos de 24h de filhotes A) machos e B) fêmeas, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os símbolos representam o nível de significância $p < 0.001$ comparado com controle (NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.8 Claro - escuro – F2

A figura 26 demonstra a avaliação do teste claro-escuro de filhotes (F2 – macho e fêmea) provindo de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Observa-se no gráfico A que houve uma redução no tempo de latência dos machos ($p < 0.01$) e em B das fêmeas ($p < 0.05$) provindos de mãe do grupo ninhada reduzida para fazer a primeira transição do lado claro para o escuro e os gráficos C e D demonstram respectivamente que filhotes (macho $p < 0.05$ e fêmeas $p < 0.01$) de mães do grupo ninhada reduzida permaneceram mais tempo no lado escuro quando comparados ao controle.

Figura 26 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de claro-escuro de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

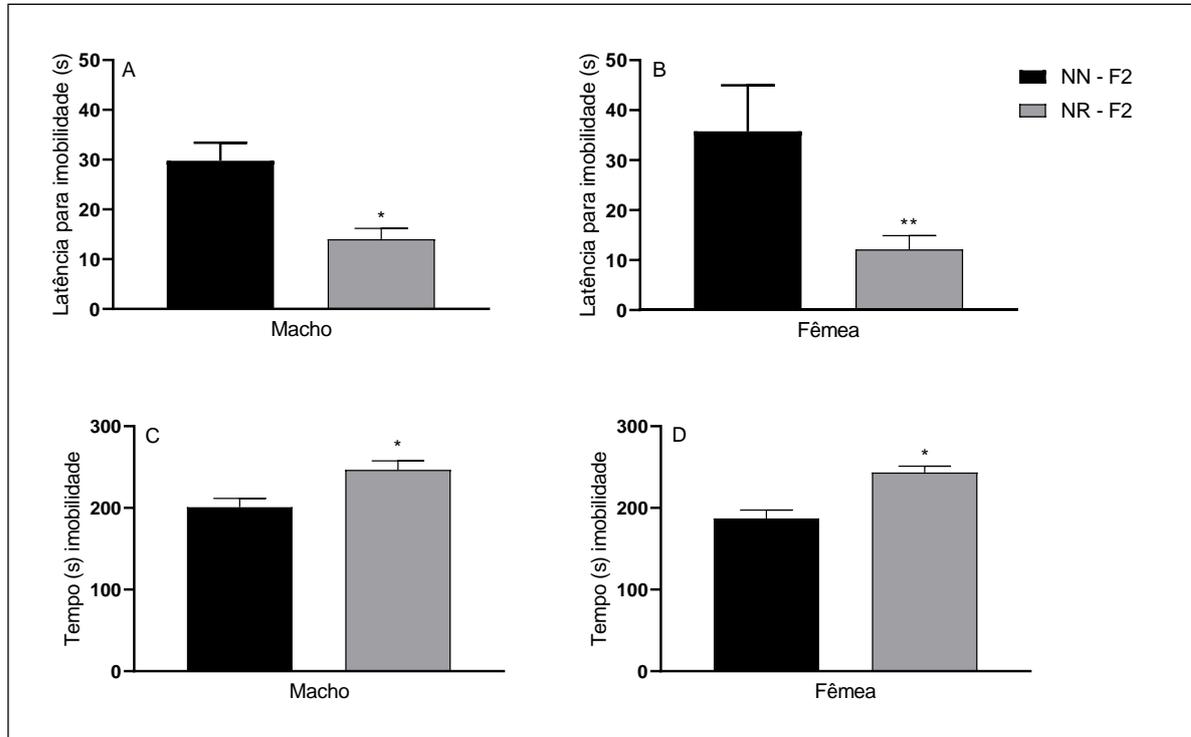
Nota: N=8 animais por grupo. Latência para atingir o lado escuro de filhotes A) machos e B) fêmeas, permanência no lado escuro de filhotes C) machos e D) fêmeas, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0.5$ e ** $p < 0.01$ comparado com controle (NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.9 Nado forçado – F2

A figura 27 mostra a avaliação do teste de nado forçado dos filhotes (F2 – macho e fêmea) provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Como podemos observar nos gráficos A e B, houve uma redução no tempo de latência dos machos ($p < 0.05$) e das fêmeas ($p < 0.001$) provindos de mãe do grupo ninhada reduzida para apresentar o primeiro comportamento de imobilidade e os gráficos C e D demonstram que os filhotes de ratas do grupo ninhada reduzida permaneceram mais tempos imóveis (macho $p < 0.05$ e fêmea $p < 0.05$) no teste quando comparados ao filhos das ratas do grupo ninhada normal.

Figura 27 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de nado forçado de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

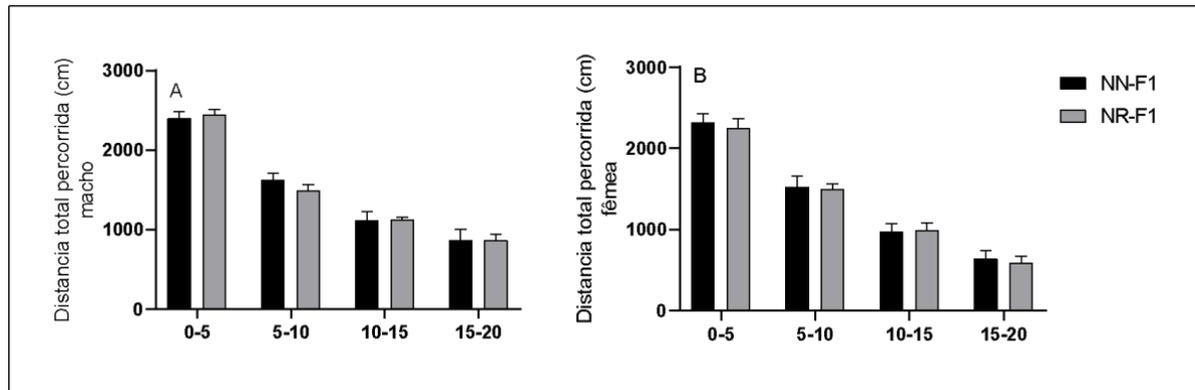
Nota: N=8 animais por grupo. Latência para imobilidade de filhotes A) machos e B) fêmeas, tempo de imobilidade dos filhotes C) macho e D) fêmea, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1(ninhada reduzida). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0.5$ e ** $p < 0.01$ comparado com controle(NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.10 Campo aberto – F2

A figura 28 mostra a avaliação da atividade locomotora no aparato de campo aberto dos filhotes (F2 – macho e fêmea) provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Como podemos observar nos gráficos A e B, a obesidade materna induzida por redução de ninhada não afetou a locomoção de seus descendentes.

Figura 28 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a atividade locomotora de seus descendentes.



Fonte: Da autora

Nota: N=8 animais por grupo. Distancia total percorrida de A) machos e B) fêmeas, NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

Quadro 2: Correlação entre os principais sintomas de crianças com TEA, comportamento tipo-autista em roedores e os resultados encontrados em nosso trabalho.

SINTOMAS DE CRIANÇAS COM TEA	COMPORTAMENTO DE ROEDORES TIPO AUTISTAS	NOSSOS RESULTADOS		
		AVALIAÇÃO	MACHOS	FÊMEA
Déficits persistentes na comunicação social	Baixa VUS	VUS	↓↓	↓
Déficits na reciprocidade socioemocional, falha em iniciar ou responder a interações sociais.	Falta de interesse em reconhecer e permanecer na maravalha do ninho	Interesse em reconhecer a maravalha do ninho	↓↓	≈
		Interesse em permanecer na maravalha do ninho	↓↓↓	↓
Comportamento repetitivos	Comportamento repetitivo / estereotipado	Comportamento repetitivo / estereotipado	↑	↑↑↑
Déficits em comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social	Pouco interesse em brincar socialmente	Interesse em brincar socialmente	↓↓↓	↓↓↓
Interesses fixos e altamente restritos e tendem a explorar o mesmo objeto	Pouco interesse em explorar novos objetos	Interesse em explorar novos objetos	↓↓↓ 2h	≈ 2h
			≈ 24h	≈ 24h

	Sem alteração ou redução na locomoção	Locomoção	≈	≈
--	---------------------------------------	-----------	---	---

Fonte: Da autora

Nota: Os símbolos representam o nível de significância ↓ ou ↑ $p < 0.5$, ↓↓ $p < 0.01$, ↓↓↓ ou ↑↑↑ $p < 0.001$ e ≈ comparado com controle(NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média ± EPM

Fonte: Da autora.

6.4 QUANTIFICAÇÃO DE SINAPTOFISINA POR WESTERN BLOTTING - F2

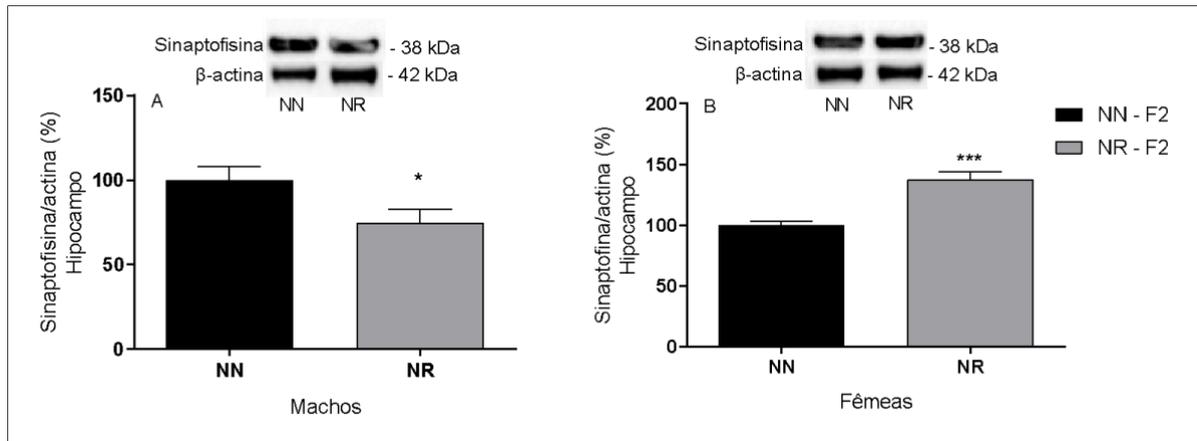
A quantificação de sinaptofisina foi realizada nas estruturas encefálicas: hipocampo e córtex pré-frontal.

6.4.1 Sinaptofisina – Hipocampo – F2

A figura 29 mostra a quantificação da proteína sinaptofisina na estrutura encefálica Hipocampal dos filhotes (F2 – macho e fêmea) provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Como podemos observar no gráfico A, houve uma redução na quantidade de sinaptofisina no hipocampo dos filhotes machos ($p < 0.05$) e em filhotes fêmeas foi observado um aumento ($p < 0.05$) quando comparados aos filhotes das ratas do grupo ninhada normal.

Figura 29 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a quantificação de sinaptofisina no hipocampo de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

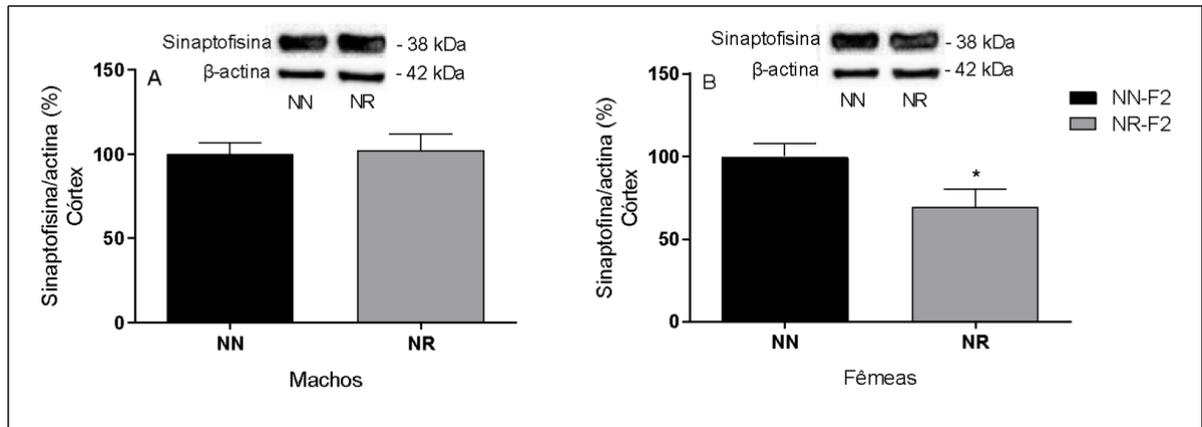
Nota: N=6 animais por grupo. A) machos e B) fêmeas. NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0.5$ e *** $p < 0.001$ comparado com controle (NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.4.2 Sinaptofisina – Córtex – F2

A figura 30 mostra a quantificação da proteína sinaptofisina no córtex dos filhotes F2 (macho e fêmea) provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Como podemos observar no gráfico A, não houve uma diferença na quantidade de sinaptofisina no córtex dos filhotes machos ($p > 0.05$) e em filhotes fêmeas foi observado uma redução ($p < 0.05$) quando comparados aos filhotes das ratas do grupo ninhada normal.

Figura 30 Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a quantificação de sinaptofisina no hipocampo de seus descendentes.



Fonte: Da autora.

Nota: N=6 animais por grupo. A) machos e B) fêmeas. NN-F2: filhotes de mães do grupo NN-F1 (ninhada normal) e NR-F2: filhotes de mães do grupo NR-F1 (ninhada reduzida). O símbolo * representa o nível de significância $*p < 0.5$ comparado com controle (NN-F2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

7 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, observamos que o método de redução do tamanho de ninhada no período neonatal das ratas F1, fez com que o grupo ninhada reduzida (NR-F1) apresentassem um aumento no ganho de peso a partir do PND8 e esse aumento se manteve na vida adulta no PND56 durante o período de gestação e lactação, e foi observado também um aumento no Índice de *Lee* e na adiposidade.

Outro estudo que também utilizou redução de ninhada em ratas *Wistar*, na proporção de 3 filhotes para o grupo NR e 12 filhotes para o grupo NN, observaram resultados semelhantes quanto ao ganho de peso, índice de *Lee* e adiposidade neste mesmo período, sugerindo que a redução do número de filhotes da prole durante o período lactacional foi eficaz para indução da obesidade quando adultos (ENES-MARQUES, GIUSTI-PAIVA, 2018).

A redução do tamanho da ninhada de ratas *Wistar* na mesma proporção utilizada em nosso estudo, 4 filhotes para ninhada reduzida e 12 filhotes para ninhada normal, demonstrou ser eficaz como modelo de estudo de obesidade na vida adulta, podendo ser observado um aumento no ganho de peso até a vida adulta juntamente com aumento da adiposidade (CLARKE, STEFANIDIS, SPENCER, 2011; SOCH, *et al.*, 2019).

Sendo assim, diante do aumento de peso das ratas F1-NR pode-se sugerir que a redução da ninhada realizada no nosso estudo foi capaz em induzir a obesidade materna.

Quanto à avaliação da atividade locomotora, em nosso estudo não observamos diferenças nos parâmetros de distância percorrida e tempo de imobilidade.

Estes animais foram submetidos ao teste de campo aberto para avaliação da atividade locomotora (KOHLLI *et al.*, 2019). A avaliação no campo aberto durante a vida adulta de camundongos que foram expostos à dieta hiperlipídica no período neonatal, demonstrou não alterar a atividade locomotora (ZILKHA, KUPERMAN, KIMCHI, 2016). Sugerindo que a obesidade gerada por redução de ninhada no período neonatal não afetou a atividade locomotora na vida adulta.

Quanto ao comportamento materno (CM), em nosso estudo não observamos diferenças entre os parâmetros avaliados.

A avaliação do CM é extremamente importante, uma vez que as alterações neste tipo de comportamento podem alterar respostas comportamentais da prole.

Por exemplo, no estudo de Ribeiro e colaboradores (2018) foi evidenciado que camundongos *Swiss* fêmeas tratadas com dieta de cafeteria durante a gestação apresentaram um aumento do comportamento materno gerando descendentes que durante a idade pré-púbere apresentaram um aumento do comportamento tipo ansioso e uma redução do tempo no teste de brincadeira social. Sendo assim, em estudos onde ocorrem avaliações dos filhotes é importante avaliar também o CM para verificar se as possíveis alterações encontradas nos filhotes são em decorrência do tratamento, no caso do nosso estudo a obesidade materna por redução de ninhada, ou do CM alterado.

Em nosso estudo, como não houve diferença entre o percentual de comportamento materno, não materno e na atividade locomotora de ratas obesas denominadas NR-F1, sugere-se que todas as alterações comportamentais encontradas em seus descendentes denominados NR-F2 são em decorrência da obesidade materna induzida pela redução de ninhada e não por alterações no CM ou de locomoção da mãe.

Com relação aos filhotes F2, em nosso estudo não observamos diferenças entre os parâmetros peso, gordura e índice de *Lee* nos grupos estudados, sugerindo que a obesidade materna induzida por redução de ninhada não altera parâmetros relacionados a obesidade de seus descendentes.

Durante a lactação observou-se uma redução no número de vocalizações ultrassônicas tanto nos filhotes machos quanto nos filhotes fêmeas de mães obesas. Sabe-se que as vocalizações ultrassônicas (VUS) são de extrema importância, pois tem um papel comunicativo essencial entre roedores mãe e filhote assim como os choros de bebês humanos, servindo para garantir o cuidado materno, sendo também usados como meio de comunicação social (PASCIUTO *et al.*, 2015; SHAIR, 2018).

A redução no número de vocalizações ultrassônicas tem sido caracterizada como déficit comunicativo sendo este um fenótipo apresentado por modelos animais com sintomas semelhantes ao autismo (BATISTA, GUISTI-PAIVA, VILELA, 2019; BRONZUOLI, *et al.*, 2018; CEZAR *et al.*, 2018; KIRSTEN *et al.*, 2018; SIMOLA, GRANON, 2019)

Assim, podemos sugerir que os animais filhotes de NR-F1, apresentam déficits na comunicação social como demonstrado pela redução da VUS.

Referente ao teste de retorno a maravalha do ninho, os animais machos F2-NR apresentaram um aumento no tempo de latência para atingir a maravalha do ninho e tanto os machos quanto as fêmeas deste mesmo grupo, apresentaram um menor tempo de permanência na maravalha do ninho. Terry e Johanson (1996) mostraram que o teste de retorno a maravalha do ninho é importante para avaliar a discriminação olfatória, sendo crucial para o desenvolvimento do comportamento e reconhecimento social. No estudo de Batista, Giusti-Paiva e Vilela (2019) foi demonstrado que ratos lactentes tipo autistas apresentam redução da discriminação olfatória.

Sendo assim, diante dos nossos resultados sugere-se que animais NR-F2 apresentam prejuízos na discriminação olfatória e comportamento semelhante ao autismo, devido à dificuldade dos filhotes NR-F2 de encontrar e de permanecer na maravalha do ninho.

Crianças com autismo apresentam padrões restritos e comportamento repetitivo (DSM-5, 2013). Em roedores tipo autistas uma das formas de avaliar este comportamento é a avaliação do número de vezes que o animal mergulha com a cabeça na placa de furos, onde o aumento do número de mergulhos com a cabeça nos buracos são considerados parâmetros de comportamento repetitivo ou estereotipado (BATISTA, GIUSTI-PAIVA, VILELA, 2019; MAKANJUOLA *et al.*, 1977).

Para avaliar este comportamento, utilizamos o teste de placa com furos na idade pré-púbere, nossos resultados demonstraram que os filhotes machos e fêmeas NR-F2 provenientes de mães obesas NR-F1, apresentaram aumento do número de mergulhos com a cabeça, sugerindo que a obesidade materna induziu comportamento estereotipado, semelhante ao autismo na próxima geração.

Sabe-se que pacientes autistas apresentam além dos comportamentos estereotipados, menos atenção a estímulos sociais, falta de interesse no envolvimento social e / ou baixos níveis de abordagem social, dificuldade em fazer amigos e de se adaptar a diversos contextos sociais e déficits nas condições que envolvem brincadeiras sociais (DÖLEN, 2015; DSM-5, 2013; MERALI, *et al.*, 2014). Em roedores tipo autistas também podemos observar dificuldade em se envolver em contextos sociais, como a redução apresentada no teste social de brincadeira (KIRSTEN *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018). Nossos animais teste NR-F2 também apresentaram redução no tempo interação no teste social de brincadeira. Assim,

sugerimos que os filhotes de mães obesas apresentam déficits nas condições sociais de brincadeira.

Crianças com autismo ainda apresentam interesses fixos e altamente restritos e tendem a explorar o mesmo objeto (DSM-5, 2013). Em roedores tipo autistas também podemos observar comportamento semelhante (BATISTA, GIUSTI-PAIVA, VILELA, 2019) Para avaliar este comportamento utilizamos o teste de reconhecimento de objetos na idade pré-púbere e foi observado que filhotes NR-F2 machos de mães obesas apresentaram um interesse maior ao objeto familiar e redução na exploração ao objeto novo, levando a uma redução no índice de reconhecimento de objetos, que estão relacionados com a persistência encontrada em animais com sintomas semelhantes ao autismo.

Além dos sintomas centrais encontrados em pacientes com TEA que são déficits na comunicação, movimentos estereotipados e interesses restritos, os transtornos de ansiedade representam o transtorno psiquiátrico mais comum, sendo encontrado em aproximadamente 40% dos casos de pacientes diagnosticados com transtorno do espectro autista. (MERALI *et al.*, 2014; ZABOSKI, STORCH, 2018).

Para avaliar este parâmetro, utilizamos o teste de claro-escuro e foi observado que F2-NR apresentaram uma redução no tempo de latência para atingir o lado escuro e um aumento no tempo de permanência no lado escuro. Sabe-se que um aumento no tempo de permanência no lado escuro do aparato é tido como um comportamento preditivo de ansiedade. Nesse sentido, um trabalho de Ribeiro e colaboradores (2018), trabalhando com a dieta de cafeteria no período gestacional em camundongos observou que filhotes provindos dessas mães permaneceram mais tempo no lado escuro do aparato e uma redução no tempo de latência para fazer a primeira transição para o lado escuro, sugerindo assim um comportamento preditivo de ansiedade nesses filhotes.

Mesmo que o protocolo de obesidade materna anteriormente citada seja diferente do modelo utilizado neste estudo, a latência para entrada e o tempo de permanência no lado escuro dos filhotes são semelhantes, podendo assim sugerir que a obesidade materna provocada pela redução de ninhada pode gerar descendes com comportamentos preditivos de ansiedade.

O transtorno depressivo, apesar da difícil caracterização em pacientes autistas por apresentar alguns sintomas que podem ser mascarados pelas características do paciente autista como o déficit na reciprocidade emocional, déficits na comunicação

verbal e não verbal e a ausência de interesse em interagir socialmente (DSM-5, 2014), apresenta uma co-ocorrência importante, afetando cerca de 0,9 a 29% dos pacientes diagnosticados com TEA (ROSEN, *et al.*, 2018; WHO, 2019;). Em roedores o teste de nado forçado é o teste mais utilizado para avaliar o comportamento tipo depressivo e estudos com camundongos tipo autistas apresentaram um maior tempo de imobilidade neste teste (SILVERMAN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2018).

Em nosso estudo observamos um maior tempo de imobilidade nos animais NR-F2, de forma semelhante ao ocorrido em modelos de camundongo tipo autista, assim, podendo assim sugerir que a obesidade materna provocada pela redução de ninhada pode gerar descendentes com comportamento tipo depressivo além de semelhantes ao autismo.

Estudos com roedores demonstram semelhanças comportamentais entre os modelos tipo autista e modelos tipo esquizofrênico, sendo o teste de pré-pulso inibitório o teste mais utilizado para diferenciar sintomas relacionados ao autismo e esquizofrenia (SUN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019a; WANG *et al.*, 2019b). Porém, nós não tivemos acesso a este teste e buscamos na literatura outras formas de diferenciá-los.

A hiperatividade locomotora é uma característica da maioria de animais tipo esquizofrênicos (COMIM *et al.*, 2015; RAVANDI *et al.*, 2019). A literatura vem demonstrando que a maioria dos modelos de roedores para estudo da esquizofrenia, induz hiperatividade locomotora (COMIM *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2010; RAVANDI *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019a; WANG *et al.*, 2019b), enquanto, estudos com modelos de roedores tipo autistas não levam alteração na locomoção (BANERJEE *et al.*, 2014; BAHI, 2016; BATISTA, GUISTI-PAIVA, VILELA, 2019; SEGAL-GAVISH *et al.*, 2016; ZILKHA, KUPERMAN, KIMCHI, 2016; WU *et al.*, 2018;) e em alguns casos apresentam redução da locomoção (BATISTA, GUISTI-PAIVA, VILELA, 2019; TILBORG *et al.*, 2017; BATINIĆ *et al.*, 2016).

Nesse sentido, avaliamos a atividade locomotora dos nossos animais no teste de campo aberto em 20min de teste, com o propósito de descobrir se nossos animais estavam com comportamento tipo autista ou tipo esquizofrênico. Como não observamos diferenças de locomoção entre os grupos, sugerimos que a obesidade materna induzida por redução de ninhada induz descendentes tipo autistas.

Vale ressaltar que o TEA em humanos afeta mais o sexo masculino do que o feminino (WHO, 2019) e em alguns testes do nosso trabalho também foi demonstrado que os machos foram mais afetados.

O TEA vem sendo associado com centenas de mutações e variações genéticas. Recentemente descobertas associaram muitas dessas variações com genes que codificam proteínas afetando vários aspectos das funções sinápticas como a sinaptofisina, (GASSOWSKA-DOBROWOLSKA, *et al* 2020).

A sinaptofisina é uma proteína de membrana nas vesículas sinápticas e é usada como um marcador específico das vesículas / terminais sinápticos, esta proteína desempenha um papel importante na liberação de neurotransmissores e no ciclo das vesículas sinápticas, sendo considerada um excelente marcador proteicos da atividade pré-sináptica no hipocampo e no córtex (WANG, *et al* 2017).

Em um estudo com filhotes machos adultos de ratas Sprague-Dawley que foram submetidas à dieta hiperlipídica e hiperglicídica por 6 semanas antes do acasalamento, durante a gestação e lactação; foi observado que houve uma redução da expressão de sinaptofisina no hipocampo (VUONG *et al*, 2017).

Em outro estudo utilizou ratas Sprague-Dawley gestantes e foi fornecido ou não dieta hiperlipídica durante as 2 últimas semanas de gestação e durante a lactação, após o desmame, seus filhotes machos também foram submetidos ou não a ingestão de dieta hiperlipídica até a vida adulta, onde foi observado uma redução da expressão de sinaptofisina no hipocampo (PAGE, JONES, ANDAY, 2014).

Vale ressaltar, que até onde sabemos, não existe na literatura dados que demonstrem como a sinaptofisina é expressa tanto no hipocampo, como no córtex de roedores com comportamento-tipo autista na idade pré-púbere.

Em nosso trabalho, observamos uma redução da expressão de sinaptofisina no hipocampo nos machos pré-púberes, mesmo que em nosso estudo o protocolo de alteração no ambiente intrauterino e neonatal, assim como a idade de avaliação da expressão de sinaptofisina sejam diferentes, tais resultados vão de encontro ao encontrado na literatura, podem sugerir que essas alterações encontradas na idade adulta, podem ser originadas em idade precoce.

Estudos recentes sugerem que a redução da expressão de sinaptofisina no hipocampo está envolvida com déficits de memória e no processo cognitivo (HAJJAR, *et al* 2013; WANG, *et al* 2017). O hipocampo é uma das principais regiões do cérebro que monitora o aprendizado e o processamento da memória. Em nosso

estudo foi observado que a expressão de sinaptofisina no hipocampo dos machos NR-F2 foi reduzida e nas fêmeas NR-F2 aumentada o que pode estar relacionado à diferença encontrada no teste de reconhecimento de objetos entre macho e fêmea NR-F2. Pode ser que o aumento de sinaptofisina nas fêmeas tenha favorecido as fêmeas no reconhecimento de objetos e o contrário pode ter ocorrido nos machos, demonstrando assim que essa proteína no hipocampo pode interferir no desempenho do teste de reconhecimento de objetos.

Com relação à expressão de sinaptofisina no córtex, foi observado que as fêmeas NR-F2 apresentaram uma redução na expressão de sinaptofisina e entre os machos não foi observada diferença na expressão de sinaptofisina na mesma região. Haddad e colaboradores (2020) observaram que alterações cognitivas no reconhecimento de objetos em camundongos não estavam relacionadas com alteração na expressão de sinaptofisina no córtex. Sendo assim, as demais alterações comportamentais encontradas em nosso trabalho que podem ser dependentes de neoplasticidade sináptica cortical não foram afetadas pelas alterações na expressão de sinaptofisina.

Estes dados em conjuntos sugerem que animais filhos de mãe obesa, cuja obesidade da mesma foi gerada na infância por redução de ninhada apresentam sintomas semelhantes ao autismo e que a sinaptofisina pode influenciar, em parte em alguns dos sintomas, de maneira sexo-dependente.

Sabemos que a incidência de crianças autistas vem crescendo demasiadamente, assim como a obesidade tanto na infância como na vida adulta e que as causas que dão origem ao autismo são multifatoriais e ainda não se sabe qual fator teria maior influência para tamanha incidência.

Diante disso, nosso estudo torna-se de grande relevância, pois ao nosso conhecimento, os dados do nosso estudo são inéditos na literatura e esta descoberta pode nos ajudar entender uma das causas do autismo já que a prevalência tanto da obesidade quanto do autismo vem crescendo a cada dia.

Além disso, nosso grupo continuará em busca de mecanismos neurogênicos e epigenéticos que possam estar associados com obesidade materna e desenvolvimento do TEA nos descendentes.

8 CONCLUSÃO

A obesidade materna induzida pela redução do tamanho da ninhada prejudica o neurodesenvolvimento comportamental, induzindo sintomas semelhantes ao autismo na prole. Além disso, as alterações encontradas na sinaptofisina no hipocampo podem estar relacionadas ao reconhecimento do objeto. Este estudo é importante para entender a etiologia dos distúrbios do neurodesenvolvimento e também para alertar a população mundial sobre as consequências negativas da obesidade materna.

REFERÊNCIAS

- ABEL EL, BILITZKE PJ. A possible alarm substance in the forced swimming test. **Physiol Behav.** (Detroit, USA). v. 48, n. 2, p. 233- 239, 1990.
- ALMEIDA MM, DIAS-ROCHA CP, SOUZA AS, MUROS MF, MENDONCA LS, PAZOS-MOURA CC, TREVENZOLI IH. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. **Br J Nutr.** (Rio de Janeiro, Brasil). v. 118, n. 10, p. 788-803, 2017.
- ANDERSON MJ, BARNES GW, BRIGGS JF, ASHTON KM, MOODY EW, JOYNES RL, RICCIO DC Effects of ontogeny on performance of rats in a novel object recognition task. **Psychol. Rep.** (Kent, USA). v. 94, n. 2, p. 437-443, 2004.
- BADILLO-SUÁREZ PA, RODRÍGUEZ-CRUZ M, NIEVES-MORALES X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** (México). v. 22, n. 3, p. 171-191, 2017.
- BAHI A. Sustained lentiviral-mediated overexpression of microRNA124a in the dentate gyrus exacerbates anxiety- and autism-like behaviors associated with neonatal isolation in rats. **Behav Brain Res.** (Emirados Árabes Unidos). v. 311, p. 298-308, 2016.
- BAIRD G, NORBURY CF. Social (pragmatic) communication disorders and autismo spectrum disorder. **Arch Dis Child.** (Londres , Reino Unido). v. 101, n. 8, p. 745-51, 2016.
- BANERJEE A, ENGINEER CT, SAULS BL, MORALES AA, KILGARD MP, PLOSKI JE. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. **Front Behav Neurosci.** (Richardson, TX, EUA). v. 8, p. 387, 2014.
- BARIBEAU DA, VIGOD S, PULLENAYEGUM E, KERNS CM, MIRENA P, SMITH IM, VAILLANCOURT T, VOLDEN J, WADDELL C, ZWAIGENBAUM L, BENNETT T, DUKU E, ELSABBAGH M, GEORGIADES S, UNGAR WJ, Z Aidman-Zait A, Szatmari P; EDITORIAL CLINICAL GUIDANCE. Repetitive Behavior Severity as an Early Indicator of Risk for Elevated Anxiety Symptoms in Autism Spectrum Disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** (Ontário, Canadá). v. 59, n. 7, p. 890-899, 2020.
- BARNES SA, DER-AVAKIAN A, YOUNG JW. Preclinical Models to Investigate Mechanisms of Negative Symptoms in Schizophrenia. **Schizophr Bull.** (San Diego, CA, USA). v. 43, n. 4, p. 706-711, 2017
- BATINIĆ B, SANTRAČ A, DIVOVIĆ B, TIMIĆ T, STANKOVIĆ T, OBRADOVIĆ ALJ, JOKSIMOVIĆ S, SAVIĆ MM. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not

adolescent rat offspring. **Behav Brain Res.** (Belgrado, Sérvia) v. 299, p. 72-80, 2016

BATISTA TH, GIUSTI-PAIVA A, VILELA FC. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutr Neurosci.** (Alfenas, MG). v. 22, n. 9, p. 655-663, 2019.

BATISTA, T.H.; VERONESI, V.B.; RIBEIRO, A.C.A.F.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F.C. Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring. **Nutr Neurosci.** (Alfenas, MG). v. 20, n. 8, p. 437-442, 2016.

BHAT S, ACHARYA UR, ADELI H, BAIRY GM, ADELI A. Autism: cause factors, early diagnosis and therapies. **Rev Neurosci.** (Columbus, OH, USA). v. 25, n. 6, p. 841-50, 2014.

BLACK RE, VICTORA CG, WALKER SP, BHUTTA ZA, CHRISTIAN P, DE ONIS M, EZZATI M, GRANTHAM-MCGREGOR S, KATZ J, MARTORELL R, UAUY R; Maternal and Child Nutrition Study Group. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Lancet.** (Baltimore, MD, EUA). v. 382, n. 9890, p. 427-451, 2013.

BLIDDAL M, OLSEN J, STØVRING H, ERIKSEN HL, KESMODEL US, SØRENSEN TI, NØHR EA. Maternal pre-pregnancy BMI and intelligence quotient (IQ) in 5-year-old children: a cohort based study. **PLoS One.** (Aarhus, Dinamarca). v. 9, n. 4, 2014.

BRIDGES RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinol.** (North Grafton, MA, EUA). v. 36, p. 178-196, 2015.

BRONZUOLI MR, FACCHINETTI R, INGRASSIA D, SARVADIO M, SCHIAVI S, STEARDO L, VERKHRATSKY A, TREZZA V, SCUDERI C. Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. **Mol Autism.** (Roma, Itália). v. 9, p. 66, 2018.

BUKHARI SHF, CLARK OE, Williamson LL. Maternal high fructose diet and neonatal immune challenge alter offspring anxiety-like behavior and inflammation across the lifespan. *Life Sci.* (Williamstown, MA, Estados Unidos). v. 197, p. 114-121, 2018.

CARLEZON WA JR, KIM W, MISSIG G, FINGER BC, LANDINO SM, ALEXANDER AJ, MOKLER EL, ROBBINS JO, LI Y, BOLSHAKOV VY, MCDUGLE CJ, KIM KS. Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behavior and neuroimmune function in mice. **Sci Rep.** v. 9, 2019.

CEZAR LC, KIRSTEN TB, DA FONSECA CCN, DE LIMA APN, BERNARDI MM, FELICIO LF. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (Belmont, MA, EUA). v. 84, p. 173-180, 2018.

CHARURI C, 1940-1981. **Como vai a sua mente? / Celso Charuri.** Associação PRÓ-VIDA. (São Paulo) v. 3 p. 126-127, 2008.

CLARKE MA, STEFANIDIS A, SPENCER SJ. Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life. **J Neuroendocrinol.** (Melbourne, Victoria, Austrália). n.3, p. 511-524, 2012.

COMIM CM, SILVA NC, PATRÍCIO JJ, PALMAS D, MENDONÇA BP, BITTENCOURT MO, CASSOL OJ JR, BARICHELO T, ZUGNO AI, QUEVEDO J, DAL-PIZZOL F. Effect of sepsis on behavioral changes on the ketamine-induced animal model of schizophrenia. **J Neuroimmunol.** (Criciúma, SC). v. 281, p. 78-82, 2015.

COMMONS KG, CHOLANIANS AB, BABB JA, EHLINGER DG. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. **ACS Chem Neurosci.** (Massachusetts, Estados Unidos). v. 8, n. 5, p. 955-960, 2017.

CUSTÓDIO CS, MELLO BSF, FILHO AJMC, DE CARVALHO LIMA CN, CORDEIRO RC, MIYAJIMA F, RÉUS GZ, VASCONCELOS SMM, BARICHELO T, QUEVEDO J, DE OLIVEIRA AC, DE LUCENA DF, MACEDO DS. Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders. **Mol Neurobiol.** (Fortaleza, CE). v. 55, n. 5, p. 3775-3788, 2018.

CZECHOWSKA N, VAN RIENEN A, LANG F, EIBERGER B, BAADER SL. An update on the Golgi staining technique improving cerebellar cell type specificity. **Histochem. Cell Biol.** (Bonn, Alemanha). v. 151, n. 4, p. 327-341, 2019.

DAVIDOWA H, PLAGEMANN A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. **Neuroreport.** (Berlin, Alemanha). v. 18, n. 5, p. 521-524, 2007.

DE BOO HA, HARDING JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. Aust N Z **J Obstet Gynaecol.** (Auckland, Nova Zelândia). v. 46, p. 4-14, 2006.

DE MOURA RF, RIBEIRO C, DE OLIVEIRA JA, STEVANATO E, DE MELLO MA. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **Br J Nutr.** (Rio Claro, SP). v. 101, n. 8, p. 1178-1184, 2009.

DEARDEN L, OZANNE SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. **Front Neuroendocrinol.** (Cambridge, Reino Unido). v. 39, p. 3-16, 2015.

DEBARBA LK. **Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em ratos juvenis e adultos.** 2017. 197f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2017.

DOBROVOLSKY AP, GEDZUN VR, BOGIN VI, MA D, ICHIM TE, SUKHANOVA IA, MALYSHEV AV, DUBYNIN VA. Beneficial effects of xenon inhalation on behavioral changes in a valproic acid-induced model of autism in rats. **J Transl Med.** (Moscou, Rússia). v. 17, 2019.

DÖLEN G. Autism: Oxytocin, serotonin, and social reward. **Soc Neurosci.** (Baltimore, MD, EUA). v. 10, n. 5, p. 450-465, 2015.

DOUKKALI Z, TAGHZOUTI K, BOUIDIDA EL, NADJMOUDDINE M, CHERRAH Y, ALAOUI K. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. **Behav Brain Funct.** (Rabat, Marrocos). v. 11, 2015.

DOW D, DAY TN, KUTTA TJ, NOTTKE C, WETHERBY AM. Screening for autism spectrum disorder in a naturalistic home setting using the systematic observation of red flags (SORF) at 18-24 months. **Autism Res.** (Florida, USA). v. 13, p. 122-133, 2020.

DSM-5 / MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE DESORDENS MENTAIS. American Psychiatric Association. (Porto Alegre) n. 5, 2014.

EKNOYAN G. A history of obesity, or how what was good became ugly and then bad. **Adv Chronic Kidney Dis.** (Houston, TX, EUA). v. 13, n. 4, p. 421-427, 2006.

ENES-MARQUES S, GIUSTI-PAIVA A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. **J Physiol Sci.** (Alfenas, MG). v. 68, n. 6, p.789-798, 2018.

ENGIN A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. **Adv Exp Med Biol.** (Ankara, Turquia). v. 960, p. 1-17, 2017.

FAHRENKROG S, HARDER T, STOLACZYK E, MELCHIOR K, FRANKE K, DUDENHAUSEN JW, PLAGEMANN A. Cross-fostering to diabetic rat dams affects early development of mediobasal hypothalamic nuclei regulating food intake, body weight, and metabolism. **J Nutr.** v. 134, n. 3, p. 648-654, 2004.

FERNANDES MR, LIMA NV, REZENDE KS, SANTOS IC, SILVA IS, GUIMARÃES RC. Animal models of obesity in rodents. An integrative review. **Acta Cir Bras.** (Berlin, Alemanha). v. 31, n. 12, p. 840-844, 2016.

FERNÁNDEZ, C. M. et al. The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. **Metabolism.** (Toledo, Spain). v. 58, n. 2, p. 204-211, 2009.

FIOROTTO ML, BURRIN DG, PEREZ M, REEDS PJ. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. **Am J Physiol.** (Houston, Texas. USA). v. 260, n. 6, p. 1104-1113, 1991.

FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.** (Bethesda, MD). v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GAŚSOWSKA-DOBROWOLSKA M, CIEŚLIK M, CZAPSKI GA, JEŃSKO H, FRONTCZAK-BANIEWICZ M, GEWARTOWSKA M, DOMINIAK A, POLOWY R, FILIPKOWSKI RK, BABIEC L, ADAMCZYK A. Prenatal Exposure to Valproic Acid Affects Microglia and Synaptic Ultrastructure in a Brain-Region-Specific Manner in Young-Adult Male Rats: Relevance to Autism Spectrum Disorders. **Int J Mol Sci.** (Varsóvia, Polônia). v. 21, n. 10, 2020.

GEMMEL M, HAZLETT M, BÖGI E, DE LACALLE S, HILL LA, KOKRAS N, HAMMOND GL, DALLA C, CHARLIER TD, PAWLUSKI JL. Perinatal fluoxetine effects on social play, the HPA system, and hippocampal plasticity in pre-adolescent male and female rats: Interactions with pre-gestational maternal stress. **Psychoneuroendocrinology**. (Athens, OH, EUA). v. 84, p. 159-171, 2017.

GHOTBI RAVANDI S, SHABANI M, BASHIRI H, SAEEDI GORAGHANI M, KHODAMORADI M, NOZARI M. Ameliorating effects of berberine on MK-801-induced cognitive and motor impairments in a neonatal rat model of schizophrenia. **Neurosci Lett**. (Kerman, Irã). v. 706, p. 151-157, 2019.

GUO C, YANG Y, SU Y, SI T. Postnatal BDNF expression profiles in pré-frontal cortex and hippocampus of a rat schizophrenia model induced by MK-801 administration. **J Biomed Biotechnol**. (Pequim, China). v. 2010, 2010.

HABBOU A, LI N, ROCHETTE L, VERGELY C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. **J Nutr**. (Dijon, França). v. 143, n. 5, p. 553-562, 2013.

HAJJAR T, GOH YM, RAJION MA, VIDYADARAN S, LI TA, EBRAHIMI M. Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. **Lipids Health Dis**. (Selangor, Malaysia). v. 12, n. 113, 2013.

HARIRI N, THIBAUT L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutr Res Ver**. (Quebec, Canadá). v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.

HASLAM D. Obesity: a medical history. **Obes Ver**. Herts, Reino Unido). v. 8, p. 31-36, 2007.

HESCHAM S, GRACE L, KELLAWAY LA, BUGARITH K, RUSSELL VA. Effect of exercise on synaptophysin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase levels in prefrontal cortex and hippocampus of a rat model of developmental stress. **Metab Brain Dis**. (África do Sul). v. 24, n. 4, p. 701-709, 2009.

HOU M, LIU Y, ZHU L, SUN B, GUO M, BURÉN J, LI X. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. **PLoS One**. (Nanjing, Chinav). 6, n. 11, 2011.

INGLE DJ. A simple means of producing obesity in the rat. **Proc Soc ExpBiol Med**. (Kalamazoo, Mich). 1949 Dec; v. 72, n.3, p. 604-605, 1949.

JOCA SR, GUIMARÃES FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology**. (Ribeirão Preto, SP). v. 185, n. 3, p. 298-305, 2006.

JONES CA, WATSON DJ, FONE KC. Animal models of schizophrenia. **Br J Pharmacol**. (Nottingham, UK). v. 164, n. 4, p. 1162-1194, 2011.

KAWABE K, MIYAMOTO E. Effects of early postnatal MK-801 treatment on behavioral properties in rats: Differences according to treatment schedule. **Behav Brain Res**. (Osaka, Japão). v. 370, 2019.

KENNEDY, G.C., The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. **J Endocrinol.** (Inglaterra). v. 16, p. 9-17, 1957.

KIM JY, KIM D, PARK K, LEE JH, JAHNG JW. Highly palatable food access during adolescence increased anxiety-/depression-like behaviors in male, but not in female, rats. **Nutr Neurosci.** (Seul, Coréia). v. 21, n. 7, p. 502-510, 2018.

KIRSTEN TB, CASARIN RC, BERNARDI MM, FELICIO LF. Pioglitazone abolishes autistic-like behaviors via the IL-6 pathway. **PLoS One.** (São Paulo). v. 13, n. 5, 2018.

KOMAROFF M. For Researchers on Obesity: Historical Review of Extra Body Weight Definitions. **J Obes.** (Brooklyn, NY, EUA). v. 2016, n. 6, p. 1-9, 2016.

KONG L, NORSTEDT G, SCHALLING M, GISSLER M, LAVEBRATT C. The Risk of Offspring Psychiatric Disorders in the Setting of Maternal Obesity and Diabetes. **Pediatrics.** (Estocolmo, Suécia). v. 142, n. 3, 2018.

KRAKOWIAK P, WALKER CK, BREMER AA, BAKER AS, OZONOFF S, HANSEN RL, HERTZ-PICCIOTTO I. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. **Pediatrics.** (Califórnia, EUA). v. 129, n. 5, p. 1121-1128, 2012.

LAZIC SE, ESSIUX L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. **BMC Neurosci.** (Switzerland). v. 14, n. 37, 2013.

LEI XY, LI YJ, OU JJ, LI YM. Association between parental body mass index and autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Eur Child Adolesc Psychiatry.** (Hunan, China). v. 28, n. 7, p. 933-947, 2019.

LÉVY F. Neuroendocrine control of maternal behavior in non-human and human mammals. **Ann Endocrinol.** (Nouzilly, France). v. 77, n. 2, 114-125, 2016.

LYALL K, PAULS DL, SANTANGELO SL, SPIEGELMAN D, ASCHERIO A. Maternal early life factors associated with hormone levels and the risk of having a child with an autism spectrum disorder in the nurses health study II. **J Autism Dev Disord.** (Boston, MA, EUA). v. 41, n. 5, 618-627, 2011.

MAENNER MJ, SHAW KA, EDS JB, WASHINGTON A, PATRICK M, DIRIENZO M, CHRISTENSEN DL, WIGGINS LD, PETTYGROVE S, ANDREWS JG, LOPEZ M, HUDSON A, BAROUD T, SCHWENK Y, WHITE T, ROSENBERG CR, LEE L-C, HARRINGTON RA, HUSTON M, HEWITT A, ESLER A, HALL-LANDE J, POYNTER JN, HALLAS-MUCHOW L, CONSTANTINO JN, FITZGERALD RT, ZAHORODNY W, SHENOUDA J, DANIELS JL, WARREN Z, VEHORN A, SALINAS A, DURKIN MS, DIETZ PM. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. **MMWR Surveill Summ.** (USA).v. 69, p. 1–12, 2020.

MAKANJUOLA RO, HILL G, MABEN I, DOW RC, ASHCROFT GW. An automated method for studying exploratory and stereotyped behaviour in rats. **Psychopharmacology**. (Edinburgh, U.K). v. 52, n. 3, p. 271-277, 1977.

MAKUSHKIN EV, MAKAROV IV, PASHKOVSKIY VE. The prevalence of autism: genuine and imaginary. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**. (Moscou, Rússia). v. 119, n. 2, p. 80-86, 2019.

MEEKING MM, MACFABE DF, MEPHAM JR, FOLEY KA, TICHENOFF LJ, BOON FH, KAVALIERS M, OSSENKOPP KP. Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. (Ontario, Canadá). v. 97, 2020.

MELANCIA F, TREZZA V. Modelling fragile X syndrome in the laboratory setting: A behavioral perspective. **Behav Brain Res**. (Roma, Itália). v. 350, p. 149-163, 2018.

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**. (Roma, Itália). n. 321, p. 113-122, 2017.

MERALI Z, PRESTI-TORRES J, MACKAY JC, JOHNSTONE J, DU L, ST-JEAN A, LEVESQUE D, KENT P, SCHWARTSMANN G, ROESLER R, SCHRODER N, ANISMAN H. Long-term behavioral effects of neonatal blockade of gastrin-releasing peptide receptors in rats: similarities to autism spectrum disorders. **Behav Brain Res**. v. 263, p. 60-69, 2014.

MORGANE P.J., MILLER M., KEMPER T., STERN W., FORBES W., HALL R., BRONZINO J., KISSANE J., HAWRYLEWICZ E., RESNICK O., The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. (Shrewsbury, MA, EUA). v. 2, n. 3, p. 137-230, 1978

MOZEŠ Š, ŠEFČÍKOVÁ Z, RAČEK Ľ. Effect of repeated fasting/refeeding on obesity development and health complications in rats arising from reduced nest. **Dig Dis Sci**. (Kosice, República Eslovaca). v. 60, n. 2, p. 354-361, 2015.

OHLENDORF JM, ROBINSON K, GARNIER-VILLARREAL M. The impact of maternal BMI, gestational weight gain, and breastfeeding on early childhood weight: Analysis of a statewide WIC dataset. **Prev Med**. (Wisconsin, EUA). v. 118, p. 210-215, 2019.

OKABE S, NAGASAWA M, KIHARA T, KATO M, HARADA T, KOSHIDA N, MOGI K, KIKUSUI T. Pup odor and ultrasonic vocalizations synergistically stimulate maternal attention in mice. **Behav Neurosci**. (Sagamihara, Japão). v. 127, n. 3, p. 432-438, 2013.

ONAVI ES, BENNO R, HALPERN T, MEHANOVIC M, SCHANZ N, SANDERS C, YAN X, ISHIGURO H, LIU QR, BERZAL AL, VIVEROS MP, ALI SF. Consequences of cannabinoid and monoaminergic system disruption in a

mouse model of autism spectrum disorders. **Curr Neuropharmacol.** (Wayne, EUA). v. 9, n. 1, p. 209-214, 2011.

PADOVAN CM, GUIMARÃES FS. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacol Biochem Behav.** (Ribeirão Preto, SP). v. 77, p. 15-19, 2004.

PAGE KC, JONES EK, ANDAY EK. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** (Pensilvânia) v. 306, n. 8, p. 527-537, 2014.

PANJWANI AA, JI Y, FAHEY JW, PALMER A, WANG G, HONG X, ZUCKERMAN B, WANG X. Maternal Obesity/Diabetes, Plasma Branched-Chain Amino Acids, and Autism Spectrum Disorder Risk in Urban Low-Income Children: Evidence of Sex Difference. **Autism Res.** (Baltimore, Maryland). v. 12, n. 10, p. 1562-1573, 2019.

PASCIUTO E, BORRIE SC, KANELLOPOULOS AK, SANTOS AR, CAPPUYNS E, D'ANDREA L, PACINI L, BAGNI C. Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. **Neurobiol Learn Mem.** (Leuven, Bélgica). v. 124, p. 71-87, 2015.

PATEL MS, SRINIVASAN M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. **J Nutr.** (Buffalo, NY, EUA). v. 140, n. 3, p. 658-661, 2010.

PLAGEMANN A, RAKE A, HARDER T, MELCHIOR K, ROHDE W, DÖRNER G. Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. **Neurosci Lett.** (Berlim, Alemanha). v. 258, p. 13-16, 1998.

RECH RL, DE LIMA MN, DORNELLES A, GARCIA VA, ALCALDE LA, VEDANA G, SCHRÖDER N. Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. **Exp. Gerontol.** (Porto Alegre, RS). v. 45, n. 5, p. 351-356, 2010.

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

RIBEIRO ACAF, BATISTA TH, VERONESI VB, GIUSTI-PAIVA A, VILELA FC. Cafeteria diet during the gestation period programs developmental and behavioral courses in the offspring. **Int J Dev Neurosci.** (Alfenas, MG). v. 68, p. 45-52, 2018.

ROSEN TE, MAZEFSKY CA, VASA RA, LERNER MD. Co-occurring psychiatric conditions in autism spectrum disorder. **Int Rev Psychiatry.** (Stony Brook, NY, EUA). v. 30, p. 40-61, 2018.

SANCHES JR, FRANÇA LM, CHAGAS VT, GASPAR RS, DOS SANTOS KA, GONÇALVES LM, SLOBODA DM, HOLLOWAY AC, DUTRA RP, CARNEIRO EM, CAPPELLI AP, PAES AM. Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini*

Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. **Front Pharmacol.** (São Luis). v. 7, n. 48, 2016.

SANCHEZ CE, BARRY C, SABHLOK A, RUSSELL K, MAJORS A, KOLLINS SH, FUEMMELER BF. Maternal pre-pregnancy obesity and child neurodevelopmental outcomes: a meta-analysis. **Obes Ver.** (Durham, NC, EUA). v. 19, n. 4, p. 464-484, 2018.

SCHERTZ HH, ODOM SL, BAGGETT KM, SIDERIS JH. Parent-Reported Repetitive Behavior in Toddlers on the Autism Spectrum. **J Autism Dev Disord.** (Bloomington, IN, EUA). v. 46, n. 10, p. 3308-3316, 2016.

SCHMIDT I, FRITZ A, SCHÖLCH C, SCHNEIDER D, SIMON E, PLAGEMANN A. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **Int J Obes Relat Metab Disord.** (Nauheim, Alemanha). v. 25, n. 8, p. 1168-74, 2001.

SCHWARTZ MW. Central nervous system regulation of food intake. **Obesity.** (Seattle, WA, EUA). v.14 Suppl 1: p.1-8, Feb; 2006.

SEGAL-GAVISH H, KARVAT G, BARAK N, BARZILAY R, GANZ J, EDRY L, AHARONY I, OFFEN D, KIMCHI T. Mesenchymal Stem Cell Transplantation Promotes Neurogenesis and Ameliorates Autism Related Behaviors in BTBR Mice. **Autism Res.** (Tel-Aviv, Israel). v. 9, n. 1, p. 17-32, 2016.

SERVADIO M, MELANCIA F, MANDUCA A, DI MASI A, SCHIAVI S, CARTOCCI V, PALLOTTINI V, CAMPOLONGO P, ASCENZI P, TREZZA V. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autisticlike symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid, *Transl. Psychiatry.* (Roma, Itália). v. 6, n.9, 2016.

SHAIR HN, Handbook of Behavioral Neuroscience, **Elsevier.** v. 25, n. 12, p. 129-137, 2018.

SILVERMAN JL, YANG M, TURNER SM, KATZ AM, BELL DB, KOENIG JI, CRAWLEY JN. Low stress reactivity and neuroendocrine factors in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Neuroscience.** (Bethesda, MD, EUA). v. 171, n. 4, p. 1197-1208, 2010.

SIMOLA N, GRANON S. Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. **Neuropharmacology.** (Cagliari, Itália). v. 159, 2019.

SMITH KB, SMITH MS. Obesity Statistics. **Prim Care.** (Gainesville, FL, EUA). v. 43, p. 121-135, 2016.

SOCH A, SOMINSKY L, DE LUCA SN, SPENCER SJ. Obesity after neonatal overfeeding is independent of hypothalamic microgliosis. **J Neuroendocrinol.** (Melbourne, VIC, Austrália). v. 31, n. 8, p. 1-12, 2019.

SPEAKMAN J, HAMBLY C, MITCHELL S, KRÓL E. Animal models of obesity. **Obes Ver.** (Zurich, Suíça). v. 8, p. 55-61, 2007.

STEFANIK L, ERDMAN L, AMEIS SH, FOUSSIAS G, MULSANT BH, BEHDINAN T, GOLDENBERG A, O'DONNELL LJ, VOINESKOS AN. Brain-Behavior Participant Similarity Networks Among Youth and Emerging Adults with Schizophrenia Spectrum, Autism Spectrum, or Bipolar Disorder and Matched Controls. **Neuropsychopharmacology**. (Toronto, ON, Canadá). v. 43, n. 5, p. 1180-1188, 2018.

SUN L, MIN L, ZHOU H, LI M, SHAO F, WANG W. Adolescent social isolation affects schizophrenia-like behavior and astrocyte biomarkers in the PFC of adult rats. **Behav Brain Res**. (Pequim, China). v. 333, p. 258-266, 2017.

SUPEKAR K, KOCHALKA J, SCHAER M, WAKEMAN H, QIN S, PADMANABHAN A, MENON V. Deficits in mesolimbic reward pathway underlie social interaction impairments in children with autism. **Brain**. (Stanford, CA, EUA). v. 141, n. 9, p. 2795-2805, 2018.

TARTAGLIONE AM, SCHIAVI S, CALAMANDREI G, TREZZA V. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**. (Roma, Itália). v. 159, p. 1-15, 2019.

TERRY LM, JOHANSON IB. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. **Dev Psychobiol**. (Davie & Boca Raton, EUA). v. 29, n. 4, 353-377, 1996.

TILBORG E VAN, ACHTERBERG EJM, KAMMEN CM VAN, DER TOORN A VAN, GROENENDAAL F, DIJKHUIZEN RM, HEIJNEN CJ, VANDERSCHUREN LJMJ, BENDERS MNJL, NIJBOER CHA. Combined fetal inflammation and postnatal hypoxia causes myelin deficits and autism-like behavior in a rat model of diffuse white matter injury. **Glia**. (Utrecht, EA, Holanda). v. 66, p. 78-93, 2018.

TREZZA V, BAARENDSE PJ, VANDERSCHUREN LJ. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. **Neuropsychopharmacology**. (Utrecht, The Netherlands). v. 34, n. 12, 2560-2573, 2009.

TREZZA V, VANDERSCHUREN LJ. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**. (Utrecht, The Netherlands). v. 197, n. 2, p. 217-227, 2008.

TRIGO A.L.O.C., **Respostas comportamentais e inflamatórias em ratos com sobrealimentação neonatal**. 2016. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**. (Colwmbia). v.83, p.103-111, 1970.

VAN'T WESTEINDE A, CAUVET É, TORO R, KUJA-HALKOLA R, NEUFELD J, MEVEL K, BÖLTE S. Sex differences in brain structure: a twin study on restricted and repetitive behaviors in twin pairs with and without autism. **Mol Autism**. (Estocolmo, Suécia). v. 11, p. 1-42, 2019.

VARCIN KJ, NEWNHAM JP, WHITEHOUSE AJO. Maternal pre-pregnancy weight and autistic-like traits among offspring in the general population. **Autism Res.** (Perth, Austrália). v. 12, p. 80-88, 2019.

VARGAS VE, GURUNG S, GRANT B, HYATT K, SINGLETON K, MYERS SM, SAUNDERS D, NJOKU C, TOWNER R, MYERS DA. Gestational hypoxia disrupts the neonatal leptina surge and programs hyperphagia and obesity in male offspring in the Sprague-Dawley rat. **PLoS One.** (Oklahoma, Estados Unidos da América). v. 12, n. 9, p. 1-27, 2017.

VERONESI VB, **Influência da dipirona sódica sobre as respostas comportamentais em camundongos fêmeas lactantes e a repercussão nos filhotes adolescentes.** 2016. 86f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas- MG, 2017.

VILELA FC, RUGINSK SG, DE MELO CM, GIUSTI-PAIVA A. The CB1 cannabinoid receptor mediates glucocorticoid-induced effects on behavioural and neuronal responses during lactation. **Pflugers Arch.** (Alfenas, MG). v. 465, n. 8, p. 1197-1207, 2013.

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.

VUONG B, ODERO G, ROZBACHER S, STEVENSON M, KERELIUK SM, PEREIRA TJ, DOLINSKY VW, KAUPPINEN TM. Exposure to gestational diabetes mellitus induces neuroinflammation, derangement of hippocampal neurons, and cognitive changes in rat offspring. **J Neuroinflammation.** (Alfenas, MG). v. 14, n. 1, 2017.

WANG B, JIN X, KUANG X, TIAN S. Chronic administration of parecoxib exerts anxiolytic-like and memory enhancing effects and modulates synaptophysin expression in mice. **BMC Anesthesiol.** v. 17, n. 1, 2017.

WANG X, DING S, LU Y, JIAO Z, ZHANG L, ZHANG Y, YANG Y, ZHANG Y, LI W, LV L. Effects of sodium nitroprusside in the acute dizocilpine (MK-801) animal model of schizophrenia. **Brain Res Bull.** (Hunan, República Popular da China) .v. 147, p. 140-147, 2019a.

WANG X, LUO C, MAO XY, LI X, YIN JY, ZHANG W, ZHOU HH, LIU ZQ. Metformin reverses the schizophrenia-like behaviors induced by MK-801 in rats. **Brain Res.** (Changsha, China).v. 1719, p. 30-39, 2019b.

WATANABE Y, NAKAJIMA K, ITO Y, AKAHORI Y, SAITO F, WOO GH, YOSHIDA T, SHIBUTANI M. Twenty-eight-day repeated oral doses of sodium valproic acid increases neural stem cells and suppresses differentiation of granule cell lineages in adult hippocampal neurogenesis of postpubertal rats. **Toxicol Lett.** (Gifu, Japan). v. 312, p. 195-203, 2019.

WEINSTOCK, M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. **Neurobiology of Stress.** (Jerusalém, Israel) v. 6, p. 3-13, 2017.

WIDEN EM, NICHOLS AR, KAHN LG, FACTOR-LITVAK P, INSEL BJ, HOEPNER L, DUBE SM, RAUH V, PERERA F, RUNDLE A. Prepregnancy obesity is associated with cognitive outcomes in boys in a low-income, multiethnic birth cohort. **BMC Pediatr.** (Austin, TX, EUA), v. 19, p. 1-10, 2019.

WINDHAM GC, ANDERSON M, LYALL K, DANIELS JL, KRAL TVE, CROEN LA, LEVY SE, BRADLEY CB, CORDERO C, YOUNG L, SCHIEVE LA. Maternal Pre-pregnancy Body Mass Index and Gestational Weight Gain in Relation to Autism Spectrum Disorder and other Developmental Disorders in Offspring. **Autism Res.** (Richmond, Califórnia, USA) v. 12, n. 2, p. 316-327, 2019.

WÖHR M, SCHWARTING RK. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res.** (Marburg, Germany). v. 354, p. 81-97, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Autism spectrum disorders**, (2019) Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>> Acesso em: 03 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**, (2018) Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

WU Y, QI F, SONG D, HE Z, ZUO Z, YANG Y, LIU Q, HU S, WANG X, ZHENG X, YANG J, YUAN Q, ZOU J, GUO K, YAO Z. Prenatal influenza vaccination rescues impairments of social behavior and lamination in a mouse model of autism. **J Neuroinflammation.** (Guangzhou, China) v. 15, p. 1-17, 2018.

ZABOSKI BA, STORCH EA. Comorbid autism spectrum disorder and anxiety disorders: a brief review. **Future Neurol.** (Gainesville, FL, EUA). v. 13, p. 31-37, 2018.

ZHANG L, HERNÁNDEZ VS, VÁZQUEZ-JUÁREZ E, CHAY FK, BARRIO RA. Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? **Front Neural Circuits.** (Ciudad de México, México). v. 10, p. 13, 2016.

ZILKHA N, KUPERMAN Y, KIMCHI T. High-fat diet exacerbates cognitive rigidity and social deficiency in the BTBR mouse model of autism. **Neuroscience.** (Rehovot, Israel) v. 345, p. 142-154, 2017.

ANEXO – APROVAÇÃO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3259-1000. Fax: (35) 3259-1083

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Obesidade materna induzida por redução de ninhada: influências no comportamento materno e comportamento da prole", registrada com o nº 09/2019, sob a responsabilidade de Fabiana Cardoso Vilela Giusti, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 22/05/2019 a 31/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	440 (24 fêmeas e 16 machos provenientes do Biotério central da UNIFAL).
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 22 de Maio de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida