

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-UNIFAL-MG

TATIANE HELENA BATISTA

**INFLUÊNCIA DA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE AS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS DE RATAS LACTANTES E A REPERCUSSÃO
COMPORTAMENTAL NOS FILHOTES MACHOS**

Alfenas – MG
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-UNIFAL-MG

TATIANE HELENA BATISTA

**INFLUÊNCIA DA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE AS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS DE RATAS LACTANTES E A REPERCUSSÃO
COMPORTAMENTAL NOS FILHOTES MACHOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Cardoso Vilela Giusti

Alfenas – MG
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Batista, Tatiane Helena

Influência da dieta hipoproteica sobre as respostas comportamentais de ratas lactantes e repercussão comportamental nos filhotes machos / Tatiane Helena Batista. -- Alfenas/MG, 2015. 96 f.

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Comportamento Materno. 2. Dieta hipoproteica. 3. Filhotes adultos. 4. Respostas ao estresse. I. Giusti, Fabiana Cardoso Vilela. II. Título.

CDD-610.73678

TATIANE HELENA BATISTA

**INFLUÊNCIA DA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE AS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS DE RATAS LACTANTES E A REPERCUSSÃO
COMPORTAMENTAL NOS FILHOTES MACHOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em: 27/02/2015

Prof.: Fabiana Cardoso Vilela Giusti

Instituição: Unifal-MG

Assinatura:



Prof.: Luciano Freitas Felício

Instituição: USP-SP


Assinatura:



Prof.: Josie Resende Torres da Silva

Instituição: Unifal-MG

Assinatura:



Dedico a Deus pelas bênçãos recebidas, aos meus pais, João e Nair, às minhas irmãs Beatriz, Jackeline e Josiane, aos meus sobrinhos Gabriel e Gabrielly, ao meu namorado Cristiano, pelo amor e compreensão; à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fabiana Cardoso Vilela Giusti, pela amizade, confiança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e por estar sempre presente em cada segundo desta jornada não me deixando desistir.

Aos meus pais, João e Nair, por me ajudarem a chegar até aqui, por me ensinarem sobre respeito, perseverança e por todo amor e carinho.

Às minhas irmãs, Beatriz, Josiane e Jackeline, pela amizade, paciência, amor e momentos de alegria.

Aos meus sobrinhos, Gabriel e Gabrielly, pelo amor e pelos sorrisos que alegam minha vida.

Aos meus cunhados, Eduardo e Ednilson, pela amizade e apoio.

Ao meu namorado Cristiano, pelo amor, paciência e compreensão.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fabiana Cardoso Vilela Giusti, pela confiança, amizade, por ter sido presente, pelo exemplo profissional e pelo encorajamento diante das dificuldades.

Ao Prof. Alexandre Giusti-Paiva, pelos conhecimentos transmitidos e exemplo profissional.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia, Vanessa Veronesi, Mara, Ana Cláudia, Sílvia, Rafaela, Layla, Ana, Luciana, Merellym, Vanessa Cardoso, Jadi, Lidiane, Nathália, Julia, Clarice, Kriss, Hérick e Délcio, pelos ensinamentos, auxílios, momentos de convivência e alegria.

Aos funcionários do laboratório de Fisiologia, José Reis, Luís Felipe, Marta e Marília, pela amizade e auxílio.

À tribo de Gade, pelas constantes orações.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Maria Antonieta Nogueira Alvarenga, pela simpatia e auxílio.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Alfenas, por contribuir com a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, embora não tenham sido mencionados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O comportamento materno (CM) é crucial para o desenvolvimento adequado dos filhotes, e alterações neste tipo de comportamento podem ocasionar mudanças comportamentais dos filhotes quando adultos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição proteica durante a gestação sobre o CM e suas consequências nos filhotes. Para isto, ratas *Wistar* foram tratadas com a dieta restrita em proteínas (6%) do dia 0 ao 15º dia de gestação (DG). Após o nascimento dos filhotes, o CM foi registrado diariamente do 2º ao 8º dia de lactação (DL), além disso foi realizada a análise do CM após separação maternal, no 9º DL. Essas mesmas análises do CM também foram realizadas nos grupos *cross-fostering* – mães adotivas tratadas com a dieta hipoproteica cuidando de filhotes cujas mães receberam a dieta normoproteica (22% de proteínas) e mães adotivas que receberam a dieta normoproteica cuidando de filhotes cujas mães receberam a dieta restrita em proteínas no período gestacional. Além disso, foram realizados testes comportamentais de campo aberto e labirinto em cruz elevado (LCE) nas mães dos grupos com ou sem a realização do *cross-fostering*. As proles provenientes do CM também foram utilizadas quando adultas para análise comportamental nos testes de campo aberto e labirinto em T elevado (LTE) em duas condições, submetidos ou não ao estresse de contenção. Adicionalmente, os filhotes adultos também foram avaliados quanto as respostas autonômicas antes, durante e após exposição ao estresse de contenção. Os resultados demonstram que filhotes de mães hipoproteicas quando cuidados por suas mães hipoproteicas apresentam um comportamento preditivo de redução da ansiedade durante a vida adulta mesmo após a situação de estresse. Isso pode ser devido essas mães serem mais motivadas a construir o ninho, além de que esses filhotes devido à restrição proteica intrauterina, demonstraram hiporresponsividade quando expostos a situações adversas na vida adulta. Além disso, após o *cross-fostering* houve alterações no comportamento e também nos filhotes machos quando adultos, alterando assim as respostas comportamentais e autonômicas de filhotes de mães hipoproteicas cuidados por mães normoproteicas.

Palavras-chave: Comportamento materno. Dieta hipoproteica. Filhotes adultos.
Respostas ao estresse.

ABSTRACT

The maternal behavior (MB) is crucial for the appropriate development of the offspring, and alterations in this kind of behavior may lead to behavioral changes in the offspring as adults. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of protein restriction during pregnancy on MB and its consequences in pups. For this purpose, *Wistar* rats were treated with protein restricted diet (6%) from day 0 to 15th of pregnancy (DP). After the birth of the pups, the MB was recorded daily from the 2th to 8th day of lactation (DL); furthermore, the MB analysis after maternal separation was performed, on the 9th DL. These same MB analyzes were also held in cross-fostering groups – adoptive mothers treated with hypoproteic diet caring for pups whose mothers received normal protein diet (22% protein), and adoptive mothers who received normal protein diet caring for pups whose mothers received restricted protein diet during pregnancy. In addition, behavioral tests of open field and elevated plus-maze (EPM) were performed on the mothers of the groups with or without cross-fostering. The offspring from the MB were also used as adults for behavioral analysis of open field and elevated T-maze (ETM) tests in two conditions, submitted or not to restraint stress. Additionally, the adult pups were also evaluated as for the autonomic responses before, during and after exposure to restraint stress. The results show that pups of hypoproteic mothers, when maintained by their hypoproteic mothers, present a predictive behavior of anxiety reduction during adulthood, even after the stress. This may be due these mothers are more motivated to build the nest, and that these puppies, due intrauterine protein restriction, demonstrated hyporesponsiveness when exposed to adverse situations in adult life. In addition, after cross-fostering, there were alterations in behavior as well as in male offspring as adults, thus changing behavioral and autonomic responses of pups of hypoproteic mothers maintained by normoproteic mothers.

Keywords: Adult pups. Hypoproteic diet. Maternal behavior. Response to stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação de parâmetros maternos.....	19
Figura 2 –	Representação esquemática da formação dos grupos experimentais.....	33
Figura 3 –	Representação do aparato de estresse por contenção.....	40
Figura 4 –	Esquema representativo do labirinto em T elevado.....	42
Figura 5 –	Avaliação do ganho de peso das ratas ao longo de toda a gestação e lactação.....	45
Figura 6 –	Avaliação da ingestão de ração e de água de ratas gestantes e lactantes.....	47
Figura 7 –	Avaliação do ganho de peso da ninhada.....	48
Figura 8 –	Avaliação do comportamento materno total.....	50
Figura 9 –	Avaliação do comportamento não materno total	52
Figura 10 –	Avaliação dos parâmetros maternos.....	54
Figura 11 –	Avaliação dos parâmetros não maternos.....	56
Figura 12 –	Avaliação da construção do ninho.....	57
Figura 13 –	Avaliação dos parâmetros maternos após separação mãe- filhote.....	59
Figura 14 –	Avaliação de parâmetros não maternos após separação mãe- filhote.....	60
Figura 15 –	Teste de labirinto em cruz elevado das mães.....	61
Figura 16 –	Teste de campo aberto das mães.....	63
Figura 17 –	Teste de labirinto em T elevado dos filhotes machos (não estressados)	65
Figura 18 –	Teste de campo aberto dos filhotes machos (não stressados)	67
Figura 19 –	Teste de labirinto em T elevado dos machos (estressados).....	69

Figura 20 –	Teste de campo aberto dos filhotes machos (estressados).....	71
Figura 21 –	Avaliação da pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos machos adultos: antes, durante e após o estresse de contenção.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta hipoproteica	34
Tabela 2 – Composição da dieta normoproteica	35
Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos no estudo.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APOM	Área pré-óptica medial
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
CM	Comportamento materno
CMT	Comportamento materno total
CñMT	Comportamento não materno total
DL	Dias de lactação
DG	Dias de gestação
DA	Dopamina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FC	Frequência cardíaca
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTE	Labirinto em T elevado
NA	Núcleo <i>accumbens</i>
OT	Ocitocina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Pressão arterial média
PVN	Núcleo Paraventricular
PRL	Prolactina
SEM	Erro padrão da média
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	COMPORTAMENTO MATERNO	18
2.2	MODIFICAÇÕES NA RELAÇÃO MÃE-FILHOTE	20
2.3	PROTEÍNAS NA GESTAÇÃO	21
2.4	CONSEQUÊNCIAS DA RESTRIÇÃO PROTEICA INTRAUTERINA	23
2.5	INTERFERÊNCIA DO CUIDADO MATERNO NA PROLE ADULTA	25
3	JUSTIFICATIVA	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GERAL	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	ANIMAIS	31
5.2	ACASALAMENTO	31
5.3	PADRONIZAÇÃO DE NINHADAS	32
5.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
5.5	DIETA HIPOPROTEICA	33
5.6	DIETA NORMOPROTEICA	34
5.7	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES	35
5.8	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA	35
5.9	AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE RAÇÃO E ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES	36
5.10	DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES	36
5.10.1	Avaliação do Comportamento Materno durante a primeira semana de lactação	36
5.10.2	Avaliação do Comportamento Materno no 9º DL após separação maternal	37
5.10.3	Labirinto em cruz elevado	38

5.10.4	Campo aberto.....	39
5.11	PERÍODO PÓS-DESMAME	39
5.12	EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO DOS FILHOTES MACHOS ADULTOS.....	39
5.13	DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS ADULTOS.....	41
5.13.1	Labirinto em T elevado	41
5.13.2	Campo aberto.....	42
5.14	RESPOSTAS AUTÔNOMICAS AO ESTRESSE.....	43
5.14.1	Registro de parâmetros cardíacos	43
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
6	RESULTADOS	45
6.1	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES.....	45
6.2	AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE RAÇÃO E DE ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES.....	46
6.3	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	47
6.4	AVALIAÇÃO DO CUIDADO MATERNO EM RATAS LACTANTES	48
6.4.1	Avaliação do comportamento materno na primeira semana de lactação	48
6.4.2	Análise do comportamento materno após separação maternal	56
6.5	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO – RATAS LACTANTES	60
6.6	CAMPO ABERTO – RATAS LACTANTES.....	62
6.7	LABIRINTO EM T ELEVADO – FILHOTES NÃO ESTRESSADOS	63
6.8	CAMPO ABERTO – FILHOTES NÃO ESTRESSADOS.....	66
6.9	LABIRINTO EM T ELEVADO FILHOTES ESTRESSADOS.....	68
6.10	CAMPO ABERTO – FILHOTES ESTRESSADOS	70
6.11	RESPOSTAS AUTÔNOMICAS AO ESTRESSE.....	72
6.12	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO	75
7	DISCUSSÃO	77
7.1	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DA INGESTÃO DE RAÇÃO E DE ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES.....	77
7.2	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	78

7.3	AVALIAÇÃO DO CUIDADO MATERNO DAS RATAS LACTANTES	79
7.3.1	Avaliação do Comportamento Materno na primeira semana de lactação	79
7.3.2	Análise do Comportamento Materno após separação maternal	80
7.4	DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E NO CAMPO ABERTO.....	82
7.5	DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS NÃO ESTRESSADOS NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO.....	83
7.6	DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO.....	85
7.7	AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS AUTONÔMICAS AO ESTRESSE.....	87
8	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

Em períodos finais da gestação, o organismo materno passa por diversas modificações fisiológicas, como uma diminuição dos níveis de progesterona e um aumento dos níveis de estradiol e prolactina (NUMAN; INSEL, 2003). Estes últimos atuam em regiões cerebrais como a área pré-óptica medial (APOM) e a porção ventral do núcleo intersticial da estria terminal dando assim início ao comportamento materno (CM), (SHEEHAN et al., 2001). O comportamento materno é definido como o conjunto de cuidados que as mães realizam em torno dos filhotes imaturos até que estes se tornem independentes e sejam capazes de sobreviver por si só (MANN, 2006).

Ao nascerem, os filhotes de ratas são incapazes de se locomover e de regular sua própria temperatura, desprovidos de pelos, cegos e surdos, sendo assim, totalmente dependentes dos cuidados maternos (GROTA; ADER, 1969; GUBERNICK; KLOPFER, 1981).

Os principais cuidados diretamente relacionados aos filhotes incluem: (1) Amamentação, em que as ratas lactantes permanecem sobre os filhotes em uma postura denominada cifose, que se caracteriza pela coluna arqueada da rata, facilitando a amamentação da prole; (2) As lambidas, que tem por função estimular a defecação e a secreção urinária dos filhotes; (3) A construção do ninho, que visa a proteção e a manutenção da temperatura corporal na ausência da mãe; (4) recolhimento dos filhotes, onde a mãe carrega seu filhote pela boca movendo-os de um local a outro no ninho, ou para transportá-los para um novo ninho (NUMAN; INSEL, 2003; NUMAN; STOLZENBERG, 2009).

Além destes comportamentos diretamente relacionado aos filhotes, as ratas lactantes também exibem comportamento tipo ansiolítico e comportamento agressivo que também fazem parte do repertório comportamental materno e contribuem para a sobrevivência da mãe e da prole (FERREIRA et al., 2002; HUNTINGFORD, 1989; MANN, 2006;).

Estudos descrevem que o CM pode sofrer influência de drogas, estresse e até mesmo de dietas, incluindo a restrição proteica, e alterar os padrões normais da relação mãe-filhote, prejudicando o comportamento futuro dos filhotes (BOSCH et

al., 2007; BELLUSCIO et al., 2014; COSTA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2013; CONNOR et al., 2012; MASSARO; LEVITSKY; BARNES, 1974)

Sabe-se que o comportamento dos filhotes na vida adulta pode sofrer a influência do CM. Entretanto, outro fator envolvido nas alterações comportamentais da prole adulta está relacionado com as alterações morfológicas e neuroquímicas no sistema nervoso central da prole (SNC) decorrentes de alterações nutricionais durante a gestação, que também resultariam em prejuízos nas respostas comportamentais (MORGANE et al., 1993).

Sendo assim, o comportamento dos filhotes na vida adulta pode estar sob a influência de duas variáveis: 1) CM no período neonatal, e 2) Alterações nutricionais durante a gestação. Portanto torna-se necessário maiores investigações para elucidar qual seria a variável envolvida nas alterações comportamentais da prole adulta. Para responder essa questão, a literatura descreve a técnica de *cross-fostering*, que consiste na adoção cruzada dos filhotes (MOORE; POWER, 1986). Deste modo, o presente estudo empregou esta técnica para avaliar qual seria o possível desencadeador das alterações dos filhotes na vida adulta.

Outra importante questão levantada neste estudo, e que até o presente momento não foi abordada na literatura, é de como estes filhotes provindos de mães com restrição proteica gestacional e com alterações no CM respondem aos testes comportamentais preditivos de medo e ansiedade quando submetidos ou não ao estresse. Além disso não é descrito possíveis variações nas respostas autonômicas desses filhotes antes, durante e após o estresse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica traz conhecimentos sobre o comportamento materno, bem como as modificações na relação mãe-filhote, a importância das proteínas na gestação, as consequências da restrição proteica intrauterina e como sua restrição durante a gestação pode interferir no comportamento da prole adulta.

2.1 COMPORTAMENTO MATERNO

Pouco antes ou logo após o parto, o organismo materno sofre diversas modificações fisiológicas que resultam em um comportamento complexo, espontâneo e instintivo chamado de comportamento materno (MATTSON et al., 2001; NUMAN, 1994). Estas alterações fisiológicas que ocorrem no organismo materno nos períodos finais da gestação estão relacionadas a um declínio dos níveis de progesterona e ao aumento da concentração de estradiol e prolactina e são responsáveis pela responsividade aos filhotes durante o período pré-natal (NUMAN; INSEL, 2003). Uma possibilidade da atuação destes hormônios é a de que estes exerceriam suas atividades em áreas do cérebro tais como a área pré-óptica medial (MPOA) e a porção ventral do núcleo intersticial da estria terminal dando início ao CM (SHEEHAN et al., 2001).

O CM é definido como um conjunto de cuidados que as mães realizam para garantir a sobrevivência da prole (MANN, 2006). Em roedores, o CM pode ser observado com mais intensidade durante as duas primeiras semanas após o parto, declinando posteriormente, até que os filhotes cresçam e se tornem independentes e capazes de se auto proverem de comida e de regular a sua temperatura. Neste momento, a mãe se torna também menos responsiva em relação às primeiras demandas da prole (NUMAN, 1994).

Mesmo antes do nascimento de sua prole, as ratas gestantes iniciam uma série de mudanças comportamentais, que incluem mudanças no seu padrão de limpeza, passando mais tempo lambendo a região mamária para que ocorra o

estímulo da ejeção de leite e iniciam a construção do ninho para o recolhimento dos filhotes. Os cuidados maternos se expressam desde a preparação da mãe para o nascimento da prole e se mantêm por todo o período de lactação. Ao nascerem, os filhotes de ratas são totalmente dependentes dos cuidados maternos, pois são parcialmente imóveis, desprovidos de pelos, surdos, cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura (GROTA; ADER, 1969; GUBERNICK; KLOPFER, 1981).

Os principais cuidados diretamente relacionados aos filhotes incluem: (1) Amamentação, em que as ratas lactantes permanecem sobre os filhotes em uma postura denominada cifose, que se caracteriza pela coluna arqueada da rata, facilitando a amamentação da prole; (2) As lambidas, que tem por função estimular a defecação e a secreção urinária dos filhotes; (3) A construção do ninho, que visa a proteção e a manutenção da temperatura corporal na ausência da mãe; (4) recolhimento dos filhotes, onde a mãe carrega seu filhote pela boca movendo-os de um local a outro no ninho, ou para transportá-los para um novo ninho (NUMAN; INSEL, 2003; NUMAN; STOLZENBERG, 2009). A figura (figura1) abaixo demonstra alguns comportamentos maternos.

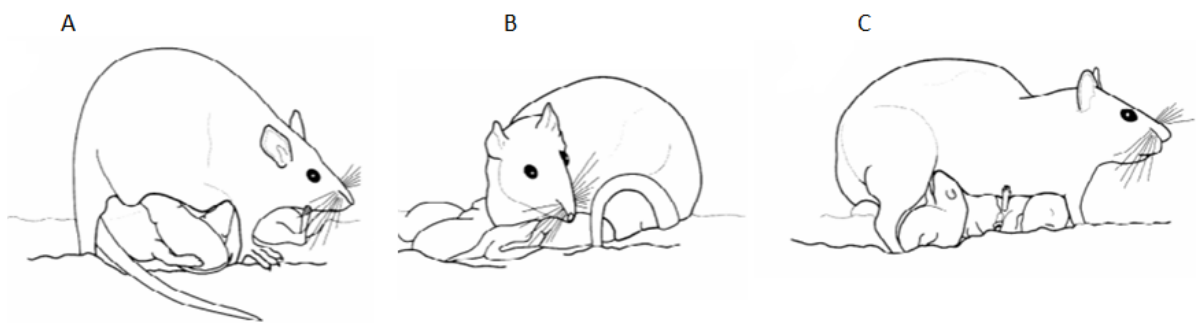


Figura 1 – Representação de parâmetros maternos.

Fonte: NUMAN, 1994.

Nota: (A) Cifose, (B) Agrupamento de filhotes, (C) Sobre os filhotes.

Além destas alterações, as ratas lactantes também exibem um comportamento indireto agressivo contra um intruso, sendo que a agressão maternal

tem a finalidade de defesa da ninhada, consistindo em comportamentos específicos exibidos pela mãe em relação a um intruso (MANN, 2006; HUNTINGFORD, 1989).

O comportamento agressivo tem sido correlacionado também com a diminuição do comportamento tipo ansioso que é denominado de ansiólise maternal (FERREIRA et al., 2002). A ansiólise maternal faz parte do repertório comportamental materno e certamente é resultado de uma adaptação do sistema nervoso central que é necessária para a sobrevivência da prole.

A responsividade reduzida à ansiedade observada durante a lactação pode ser explicada, pelo menos em parte, por um aumento da secreção de ocitocina e prolactina já que ambos possuem propriedades ansiolíticas. Estudos demonstraram que altos níveis de ocitocina e prolactina diminuem a responsividade emocional observada na lactação, evidenciando que alterações nos níveis desses hormônios podem levar a modificações no comportamento materno (FLEMING; ROSENBLATT, 1974; FLEMING; WALSH, 1994; NUMAM, 1994; NEUMANN, 2008).

O comportamento diretamente relacionado aos filhotes, o comportamento agressivo e a redução do comportamento tipo ansioso fazem parte do repertório comportamental materno e são de extrema importância para garantir a sobrevivência própria e de seus filhotes. Entretanto, variações no cuidado da mãe para com a prole durante o período neonatal podem afetar e influenciar os filhotes quando adultos (CIRULLI; BERRY; ALLEVA, 2003; URIARTE et al., 2007).

2.2 MODIFICAÇÕES NA RELAÇÃO MÃE-FILHOTE

Vários fatores podem interferir com o início e manutenção do CM e assim modificar a expressão habitual dos comportamentos maternos. Estudos do nosso laboratório demonstraram que o agonista para o receptor canabinóide induziu um aumento na latência para a recuperação do primeiro filhote para o ninho, redução no tempo de lambida e diminuição do tempo gasto em cifo. Além da redução dos parâmetros maternos, observou-se que as ratas lactantes tratadas com este agonista ainda apresentaram redução da atividade de neurônios ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo supra-óptico (regiões

envolvidas na síntese de ocitocina) e consequente redução dos níveis plasmáticos de OT (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

Do mesmo modo, fatores ambientais como a exposição ao estresse (social e estresse por contenção) durante o período gestacional é capaz de alterar os cuidados maternos acarretando com a redução do tempo gasto pelas mães lambendo ou carregando a prole (BOSCH et al., 2007).

Além dessas alterações, a literatura descreve que as alterações na dieta de ratas durante a gestação e/ou lactação interferem no comportamento materno. Connor e colaboradores (2012), demonstraram que ratas tratadas com uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação apresentaram redução do tempo de lambida dos filhotes, no entanto, este mesmo autor relata que os mecanismos pelos quais a nutrição interfere nos cuidados maternos permanecem desconhecidos.

Com relação a carência proteica durante períodos iniciais do desenvolvimento, esta também pode influenciar nas respostas comportamentais de ratas lactantes. Mães com desnutrição proteica apresentam um aumento do comportamento materno, permanecendo mais tempo no ninho e amamentando mais seus filhotes quando comparadas ao controle (MASSARO; LEVITSKY; BARNES, 1974).

Em contraste, um recente estudo de Belluscio e colaboradores (2014), demonstraram que mães alimentadas com uma dieta restrita em proteínas durante a gestação e lactação apresentaram diminuição do comportamento materno com uma redução no tempo de lambida dos filhotes em relação as mães controle. As contradições nos resultados encontrados por estes autores, provavelmente devem-se a diferenças nas composições da dieta, período no qual ela é administrada e diferentes linhagens de animais utilizadas nos estudos.

Como descrito, diversos parâmetros do comportamento materno podem ser modificados por diferentes fatores. Entretanto os efeitos da desnutrição proteica sobre os cuidados maternos são contraditórios e escassos na literatura, sendo evidente a importância da avaliação de possíveis alterações do comportamento materno em decorrência do baixo consumo de proteínas.

2.3 PROTEÍNAS NA GESTAÇÃO

O estado nutricional de mulheres antes e durante o período gestacional é de extrema importância para o crescimento e o desenvolvimento do feto (BARKER et al., 1993). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a suplementação de proteínas e energia equilibradas melhora o crescimento do embrião e reduzem o risco de morte.

Dados recentes da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization*, FAO) demonstram que o número de pessoas subnutridas no mundo entre os períodos 2012-2014 é de 805 milhões de pessoas (11%), sendo a desnutrição especialmente comum entre as populações de baixa renda. A desnutrição ainda é considerada pela OMS um problema de saúde nos países em desenvolvimento e, de acordo com a FAO, o baixo consumo de proteínas ainda é um problema comum em regiões da África Subsaariana, Norte da África e Oriente Médio.

As proteínas são complexos orgânicos compostos por aminoácidos e são encontradas em alimentos de origem animal e vegetal. São os principais constituintes das células e tecidos do corpo sendo necessárias para a manutenção do organismo, reparação e substituição de tecidos danificados, produção de enzimas metabólicas e digestivas e são constituintes essenciais de certos hormônios (FAO, 2013).

Mulheres no período gestacional possuem um estado nutricional debilitado devido à alta demanda nutricional requerida pelo feto em desenvolvimento. Assim, as tendências mais recentes presentes na literatura, recomendam que na gestação uma ingestão proteica de cerca de 1,1g/Kg/dia (1/3 de origem animal e 2/3 de origem vegetal) ocorra (SHILS et al., 2006), diferindo, desta forma, do consumo sugerido para uma mulher adulta normal e não grávida, onde a ingestão de proteínas seria de cerca de 0,8g/Kg/dia (1/3 de origem animal e 2/3 de origem vegetal) (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

Além de ser uma importante fonte nutricional para o desenvolvimento fetal, as proteínas também são de extrema importância para a nutrição materna. Mães desnutridas apresentam um risco aumentado de parto prematuro devido a uma supressão das funções imunológicas e aumento do estresse oxidativo. A deficiência de proteínas e/ou micronutrientes pode prejudicar a capacidade

antioxidante das células, pois as proteínas fornecem os aminoácidos necessários para a síntese de enzimas de defesa antioxidantes (RASMUSSEN; YAKTINE, 2009).

Neste contexto, pode-se observar que as proteínas correspondem aos nutrientes de máxima importância durante o período gestacional, e sua restrição pode acarretar prejuízos não somente para a mãe, mas também para o embrião em desenvolvimento. Portanto a adequação nutricional na gestação proporciona um estado nutricional apropriado para a saúde materna e para o suprimento das necessidades do feto.

2.4 CONSEQUÊNCIAS DA RESTRIÇÃO PROTEICA INTRAUTERINA

Várias teorias para explicar o surgimento de doenças na vida adulta em detrimento de déficits nutricionais durante o período embrionário são descritos na literatura. Por exemplo, o conceito de programação fetal é amplamente empregado para expressar a relação entre adversidade na vida intrauterina e o desenvolvimento de doenças na vida adulta. A programação fetal considera que a injúria nutricional em períodos críticos do desenvolvimento teria um efeito duradouro na estrutura e função do organismo do feto (LUCAS, 1991; LUCAS, 1998).

Em 1993, Barker e colaboradores, descreveram que a deficiência nutricional durante o desenvolvimento embrionário programaria ao desenvolvimento de doenças na idade adulta, ou seja, segundo a “teoria de Barker” ou Teoria da origem fetal das doenças do adulto, o ambiente intrauterino adverso conduz a alterações permanentes na vida adulta. Deficiências nutricionais ou fatores ambientais durante o período gestacional originam uma adaptação metabólica e/ou estrutural permanente que aumenta o risco de doença coronária, hipertensão arterial, diabetes e acidente vascular cerebral (BARKER, 1995).

Além das alterações acima citadas, o estado nutricional da mãe também é de extrema importância para o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) da prole. Deficiências nutricionais durante períodos críticos do desenvolvimento podem levar a alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC que resultariam em prejuízos para comportamentos mediados por circuitos cerebrais (MORGANE et al., 1993). A falta de micronutrientes tais como vitaminas ou minerais, podem afetar a

maturação cerebral, entretanto a carência de proteínas parece ser o fator mais crítico para o desenvolvimento de todas as funções neurobiológicas, além disso a idade e a duração da desnutrição proteica são fatores críticos para determinar seus efeitos sobre o cérebro (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Estudos de Debassio e colaboradores (1994), ainda demonstraram que a desnutrição protéica é capaz de alterar o número de células, as sinapses e a mielinização neuronal. A restrição proteica administrada durante 15 dias de gestação também foi capaz de provocar atrasos na astrogênese, anormalidades na diferenciação e sinaptogênese neuronal (GRESSENS et al., 1997).

Além destas alterações, já é bem estabelecido que a desnutrição proteica é capaz de afetar a neurotransmissão catecolaminérgica, serotoninérgica e gabaérgica (ROTTA et al., 2003; STEIGER et al., 2003; WIGGINS; FULLER; ENNA, 1984).

Considerando-se que as alterações nutricionais durante o desenvolvimento intrauterino podem predispor a prole a doenças tardias na vida, e que as proteínas são extremamente importantes para o desenvolvimento normal do cérebro, muitos estudos centram-se nas alterações comportamentais decorrentes da carência proteica na gestação.

Estudos demonstram a íntima relação entre deficiência proteica/comprometimento estrutural e modificações comportamentais. Com relação ao comprometimento estrutural, neurônios do sistema límbico parecem ser os mais sensíveis aos efeitos da desnutrição (LISTER et al., 2006; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Assim, parâmetros de cognição, aprendizado, memória, e o comportamento tipo ansioso dependem do desenvolvimento adequado de estruturas límbicas e áreas neurais associadas (MORGANE et al., 1993; MORGANE; GALLER; MOKLER, 2005).

A desnutrição por deficiência proteica durante a gestação e/ou lactação podem prejudicar as respostas comportamentais de ratos em vários modelos de ansiedade. Por exemplo, o teste de labirinto em cruz elevado indica que animais desnutridos apresentam diminuição do comportamento tipo ansioso (diminuição do tempo de latência para sair dos braços fechados), (HERNANDEZ et al., 2005).

Estudos de Hernandez e colaboradores (2005) demonstraram que a desnutrição proteica gestacional foi capaz de provocar nos filhotes um menor tempo para escapar dos braços fechados do teste de labirinto em T elevado, sugerindo que

a desnutrição proteica altera os mecanismos neurais que controlam o comportamento no labirinto em T elevado.

Estudos demonstraram que a restrição de proteínas durante a gestação e lactação, além de provocar um comportamento tipo depressivo na prole fêmea também gerou um comportamento tipo ansioso nas mães (BELLUSCIO et al., 2014), demonstrando que as respostas comportamentais dos filhotes e das mães podem sofrer influência da restrição proteica gestacional.

Conhecendo-se que a baixa ingestão de proteínas pode interferir em diversas respostas comportamentais, o presente estudo verificou se a restrição proteica administrada durante as duas primeiras semanas de gestação poderia interferir em parâmetros preditivos de ansiedade das mães e em parâmetros preditivos de medo e pânico dos filhotes durante a vida adulta.

2.5 INTERFERÊNCIA DO CUIDADO MATERNO NA PROLE ADULTA

A literatura descreve que os cuidados maternos no período neonatal está envolvido com o desenvolvimento cognitivo e emocional da prole (KAFFMAN; MEANEY, 2007), e variações no cuidado da mãe para com a prole durante este período podem afetar e influenciar os filhotes na vida adulta (LIU et al., 1997).

Em roedores, a primeira semana de vida pós-natal é um período crítico de sensibilidade, onde estímulos sofridos durante tal período de desenvolvimento podem persistir na vida do animal (ROTS et al., 1996), demonstrando desta forma que a avaliação do comportamento materno na primeira semana de lactação pode representar uma importante análise para investigar as alterações dos filhotes na vida adulta.

Alguns estudos mostram que os animais nascidos e criados por mães classificadas como “*high licking*” (classificação dada às mães que lambem mais sua prole e por isso são consideradas boas mães) apresentaram ansiedade diminuída no teste do campo aberto (CALDJI et al., 1998; URIARTE et al., 2007). Além disso, fêmeas que receberam maior quantidade de lambidas no período neonatal passaram mais tempo com seus filhotes quando se tornaram mães (FRANCIS et al., 1999).

Em adição, Menard e colaboradores (2004), demonstram que os filhotes de mães *high licking* são hiporresponsivos ao medo no *probe-burying test* quando comparados com aqueles de mães “*low licking*” (classificação dada às mães que lambem menos sua prole e por isso elas não são consideradas boas mães). Tem sido proposto que o comportamento de lambida das mães nos filhotes modifique circuitos neurais associados à redução do medo, tornando-os hiporresponsivos a ambientes aversivos durante a fase adulta (MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004).

Conhecendo-se que as alterações do comportamento materno podem influenciar as respostas comportamentais dos filhotes durante a vida adulta, estudos do nosso laboratório demonstraram que infusão intracerebroventricular de agonista para o receptor canabinóide levou a uma diminuição no tempo gasto pelas mães lambendo os filhotes e ao aumento de parâmetros não maternos. Conseqüentemente, durante a vida adulta, os filhotes provindos de mães que apresentaram estas alterações no comportamento materno apresentaram um aumento da responsividade ao medo durante a vida adulta. Considerando-se que a droga foi administrada intracerebroventricular e que não houve sua passagem pelo leite materno, pode-se considerar que esta alteração apresentada pelos filhotes deve-se exclusivamente a alteração do cuidado materno durante o período de lactação (COSTA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2013).

Como já descrito, a restrição de proteínas é capaz de alterar o CM e ainda influenciar nas respostas comportamentais dos filhotes durante a vida adulta. Além de influências comportamentais, as modificações no CM também influenciam na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), por exemplo, a prole de mães com alto índice de cuidado materno, quando adultos, apresentam respostas de menor temor frente a novos acontecimentos e baixa ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) quando comparado com os filhotes de mães pouco cuidadoras (CHAMPAGNE; MEANEY, 2001; PRYCE et al., 2001).

Diante disso, o presente trabalho investigou as possíveis alterações no CM decorrentes da ingestão restrita em proteínas durante as duas primeiras semanas de gestação e como estas alterações poderiam influenciar nos parâmetros preditivos de medo, pânico e comportamento tipo ansioso dos filhotes durante a vida adulta em situações de exposição ou não ao estresse, e avaliação de possíveis alterações nas respostas autonômicas destes filhotes antes, durante e após uma

situação de estresse e se estas respostas estariam relacionadas a alterações no CM, ou a dieta restrita em proteínas que a mãe recebeu durante o período gestacional.

É de grande importância a avaliação dos parâmetros acima citados, uma vez que a literatura descreve que filhotes provenientes de mães com restrição proteica gestacional podem apresentar hipertensão durante a vida adulta (WOODS et al., 2001). Entretanto, até o presente momento não existem relatos na literatura de como estes filhotes provindos de mães com restrição proteica gestacional e com alterações no CM respondem autonomicamente antes, durante e após o estresse. Para a indução do estresse durante a vida adulta, o presente trabalho empregou o modelo de estresse por contenção, que não é doloroso e não debilita o animal (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009), além de ser capaz de provocar a liberação de glicocorticoides (MACCARI et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Durante a gestação é de extrema importância que a mãe mantenha uma alimentação equilibrada para suprir as necessidades do feto em desenvolvimento. Alterações nutricionais durante o período pré-natal, como por exemplo, a restrição de proteínas, são descritas na literatura como responsáveis por alterações no CM e também alterações comportamentais da prole na vida adulta. Contudo, a literatura não descreve como estes filhotes provindos de mães com restrição proteica e alterações no CM respondem a parâmetros preditivos de medo e ansiedade em situações de exposição ou não ao estresse, e de como se apresentam as respostas autonômicas antes, durante e após a exposição ao estresse desta prole adulta. Assim, este estudo torna-se pertinente para maiores conhecimentos acerca das alterações do CM e ainda alterações comportamentais e autonômicas dos filhotes previamente submetidos a situação de estresse e se estas alterações comportamentais dos filhotes adultos é decorrente do CM alterado ou da dieta restrita em proteínas durante a gestação.

4 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho:

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da restrição proteica gestacional sobre as respostas comportamentais das ratas lactantes e em parâmetros comportamentais de seus filhotes machos adultos previamente submetidos ou não ao estresse de contenção e ainda avaliar as respostas autonômicas destes filhotes antes, durante e após o estresse.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o do ganho de peso das ratas gestantes e lactantes;
- b) Avaliar a ingestão de ração e de água das ratas gestantes e lactantes;
- c) Avaliar o ganho de peso da ninhada;
- d) Verificar a influência da dieta hipoproteica sobre o comportamento materno de ratas lactantes;
- e) Avaliar a influência da dieta hipoproteica sobre as respostas comportamentais de ratas lactantes expostas aos aparatos de campo aberto e labirinto em cruz elevado;
- f) Avaliar a influência da dieta hipoproteica e do CM sobre as respostas comportamentais de filhotes adultos (estressados e não stressados) expostos aos aparatos de campo aberto e labirinto em T elevado;

- g) Avaliar a influência da dieta hipoproteica e do CM sobre as respostas autonômicas (pressão arterial média – PAM – e frequência cardíaca – FC) de filhotes adultos (estressados e não stressados);
- h) Verificar se as possíveis alterações nos filhotes é decorrente da dieta ou de alterações no comportamento materno através de *cross-fostering*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas *Wistar* pesando de 250 a 300g, a partir de sete semanas de vida provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. As ratas foram alojadas no biotério do laboratório de Fisiologia na UNIFAL-MG, campus Alfenas em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção e tratadas com ração comercial (22% de proteína), ou ração hipoproteica (6% de proteína) e água “*ad libitum*” e mantidas em sala climatizada a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclo 12 horas claro-escuro. Também foram utilizados ratos da mesma linhagem (pesando entre 250 a 300g) para o acasalamento. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da UNIFAL-MG (CEUA - protocolo nº 549/2014).

5.2 ACASALAMENTO

O acasalamento foi realizado ao final do dia, sendo as ratas transferidas para caixas com rato sexualmente experiente na proporção de três fêmeas para um macho, sendo a fecundação confirmada através de análise do lavado vaginal no dia seguinte pela manhã. O dia em cuja manhã foi constatada presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerado como sendo o dia 0 de gestação (0 DG), sendo as ratas separadas individualmente em caixas até o nascimento dos filhotes.

5.3 PADRONIZAÇÃO DE NINHADAS

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado como 1º dia de lactação (1ºDL). No 2º dia de lactação logo pela manhã (7:00 - 8:00 h), as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes, sendo quatro machos e quatro fêmeas para todos os procedimentos experimentais. As ninhadas foram chamadas de: ninhada/ou filhotes normoproteicos (FN), ou seja, filhotes cujas mães receberam a dieta normoproteica durante toda a gestação, e ninhada/ou filhotes hipoproteicos (FH) cujas mães receberam a dieta hipoproteica do 0 ao 15º DG.

5.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo 1: MN-FN

- Mães que receberam a ração normoproteica (22%) do dia 0 de gestação até o nascimento dos filhotes (21dias), foram chamadas de mães normoproteicas (MN), estas mães permaneceram com os seus respectivos filhotes, chamados de filhotes normoproteicos (FN), até o período de desmame, no 22º DL, constituindo assim o grupo MN-FN.

Grupo 2: MH-FH

- Mães que receberam a dieta hipoproteica (6%) do dia 0 de gestação até o 15º DG, onde foi retirada a ração hipoproteica e retornada a ração normoproteica até o nascimento dos filhotes. Estas mães foram chamadas de mães hipoproteicas (MH) e permaneceram com os seus respectivos filhotes, chamados de filhotes hipoproteicos (FH), até o período de desmame no 22º DL, constituindo o grupo chamado de MH-FH.

Grupo 3:MN-FH

- Para a formação deste grupo, foi adotado o método de adoção cruzada também chamado de *Cross-Fostering* (MOORE; POWER, 1986). Neste método, mães (MN) passaram a cuidar de filhotes (FH) já a partir do 2º DL, constituindo assim o grupo MN-FH, ou seja, mães normoproteicas que cuidaram de filhotes hipoproteicos desde a padronização dos filhotes no 2ºDL até o período de desmame no 22º DL.

Grupo 4:MH-FN

- O método de adoção cruzada também foi adotado para a formação deste grupo. Portanto, mães (MH) passaram a cuidar de filhotes (FN), ou seja, mães hipoproteicas que cuidaram de filhotes normoproteicos desde a padronização dos filhotes no 2ºDL até o período de desmame no 22º DL.

Representação esquemática da formação dos grupos experimentais (figura 2):

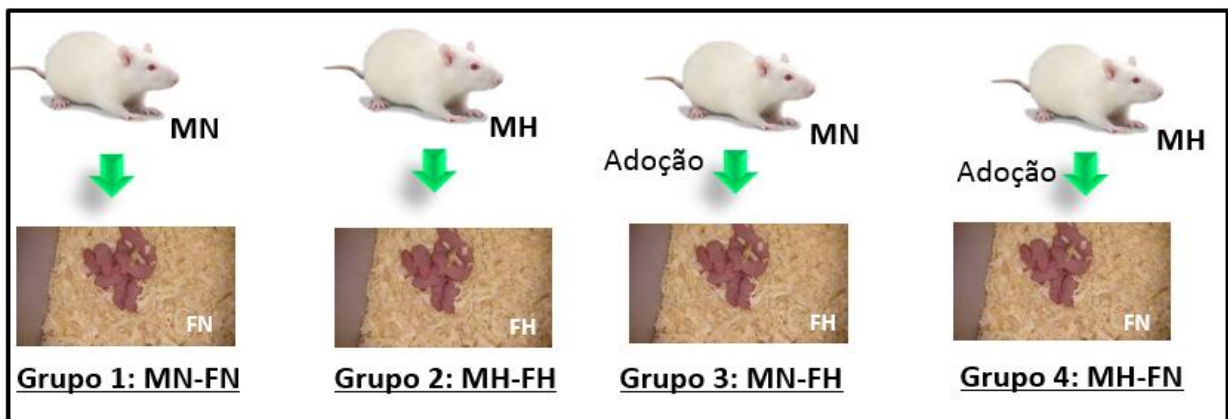


Figura 2 – Representação esquemática da formação dos grupos experimentais.

5.5 DIETA HIPOPROTEICA

A dieta hipoproteica a qual os animais foram submetidos foi proveniente da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências: (AIN) *American Institute of Nutrition*, (Dieta AIN 93 M- Modificada 6%): Dieta Experimental para Animal de Laboratório

isenta de registro no Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sua composição centesimal e o valor energético estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – Composição da dieta hipoproteica

COMPONENTES	%
Amido de milho	50,26
Caseína	7,14
Amido dextrinizado	16,65
Sacarose	12,10
Óleo se soja	4,0
Celulose microcristalina	5,0
Mistura de mineral AIN 93G*	3,50
Mistura de vitamina AIN 93	1,0
L- cistina	0,10
Bitartarato de colina	0,25

(Uma porção de 1000g corresponde ao valor energético de 3850 Kcal/Kg).

5.6 DIETA NORMOPROTEICA

A dieta normoproteica a que foram submetidos os animais do grupo controle é definida por ração específica para animais de laboratório (camundongos e ratos): Nuvilab®, grupo Quimtia, com registro no Ministério da Agropecuária sob número PR-04453 03497. Sua composição centesimal e o valor energético estão representados na tabela 2.

Tabela 2 – Composição da dieta normoproteica

COMPONENTES	%
Umidade	12
Gordura	4
Cinza	9
Fibra	7
Proteína	22
Carboidrato	46

(Uma porção de 1000g corresponde ao valor energético de 3000 Kca/Kg)

5.7 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

As ratas prenhes foram pesadas a cada três dias durante todo período de gestação, sendo 8 registros de peso no 0, 3^o, 6^o, 9^o, 12^o, 15^o, 18^o, 21^o dia de gestação. Após o nascimento dos filhotes, as ratas também foram pesadas a cada três dias, sendo 7 registros de peso no 2^o, 5^o, 8^o, 11^o, 14^o, 17^o e 20^o dia de lactação.

5.8 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA

O peso da ninhada foi registrado a partir do 2^o dia e a cada 3 dias de lactação. Foram então 7 registros de peso da ninhada, sendo no 2^o, 5^o, 8^o, 11^o, 14^o, 17^o e 20^o dia de lactação.

5.9 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE RAÇÃO E DE ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

As ratas prenhes foram submetidas ao controle diário da ingestão de ração e do volume de água (0 – 21º DG) tanto para mães normoproteicas quanto para mães hipoproteicas. Após o nascimento dos filhotes, o registro da ingestão de ração e de água pelas mães lactantes ocorreu somente até o 8º DL (0 – 8º DL).

5.10 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES

A seguir serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a análise comportamental das ratas lactantes:

5.10.1 Avaliação do Comportamento Materno durante a primeira semana de lactação

No 2º dia de lactação as ratas foram transferidas para caixas de acrílico a fim facilitar a visualização de seu interior. O comportamento de cada rata lactante foi registrado durante 4 períodos diariamente do 2º até o 8º dia de lactação. Foram 4 sessões diárias de 72 minutos de observação cada, as quais ocorreram em horários regulares, sendo 3 análises durante a fase clara (8:00, 12:00 e 16:00horas) e 1 análise durante a fase escura (20:00horas) do ciclo claro-escuro (CHAMPAGNE et al., 2003). Em cada sessão, o comportamento das ratas lactantes foi registrado a cada 3 min, contabilizando um total de 25 observações por período x 4 períodos por dia = 100 observações/rata/dia) (CHAMPAGNE et al., 2003; CALDJI et al., 1998).

Os comportamentos registrados foram divididos em maternais e não maternais.

Comportamento maternal:

- 1- Porcentagem do número de vezes em que a rata fica sobre a ninhada em posição apropriada à amamentação (posição arqueada ou cifose);
- 2- Porcentagem do número vezes em que a rata fica sobre a ninhada sem estar em posição arqueada (sobre os *pups*);
- 3- Porcentagem do número vezes em que a rata fica em posição passiva (deitada de lado) para a amamentação dos filhotes (passiva);
- 4- Porcentagem do número vezes de lambida nos filhotes (lambendo *pups*);
- 5- Porcentagem do número vezes construindo o ninho (construindo o ninho);
- 6- Porcentagem do número de vezes em que a rata lactante estimulou os mamilos para a amamentação (*self grooming* maternal).

Comportamento não maternal:

- 1- Porcentagem de vezes em que a rata permanece fora do ninho e se alimentando (sem *pups* alimentando);
- 2- Porcentagem de vezes em que a rata permanece sem os filhotes e explorando o ambiente (sem *pups* explorando);
- 3- Porcentagem de vezes em que a rata permanece sem os filhotes e não explorando o ambiente (sem *pups* não explorando).

5.10.2 Avaliação do Comportamento Materno no 9ºDL após separação maternal

No 8º dia de lactação, após a análise do comportamento materno crônico do período das 20:00 horas, os filhotes foram separados de suas mães e alojados em caixas de luz adequadas para a manutenção de sua temperatura corporal, e suas respectivas mães foram transferidas para salas de filmagem para posterior ambientação. No dia seguinte, após um período de no mínimo 12 horas de separação maternal, os filhotes foram devolvidos na gaiola moradia no lado oposto ao ninho inicial e distribuídos de forma não homogênea. Em seguida foram

realizadas filmagens de 30 minutos e análise dos parâmetro maternas e não maternas.

Comportamento Maternal:

- 1- Latência em segundos para buscar cada filhote e levá-lo ao ninho;
- 2- Tempo em segundos em que a lactante fica sobre a ninhada em posição apropriada à amamentação (posição arqueada ou cifose);
- 3- Tempo em segundos de lambida nos filhotes (lambendo *pups*);
- 4- Tempo em segundos construindo o ninho;
- 5- Tempo em segundos que a lactante fica sobre a ninhada sem estar em posição arqueada (*other*);

Comportamento não Maternal:

Tempo em segundos em que a lactante permanece fora do ninho (tempo *off*), ou seja, tempo em que a rata lactante está fora do ninho alimentando-se, explorando ou não o ambiente.

5.10.3 Labirinto em cruz elevado

O teste de labirinto em cruz elevado consiste em um aparato com dois braços abertos e dois braços fechados, ligados por uma plataforma central. No 9º DL, as ratas lactantes foram colocadas no centro do aparato, de frente para um dos braços fechados. O comportamento da rata lactante foi filmado durante 5 minutos, avaliando-se como parâmetros de ansiedade a frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados (BISON et al., 2009). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

5.10.4 Campo aberto

Imediatamente após o teste de labirinto em cruz elevado, os animais foram colocadas individualmente em uma caixa de 60 x 60 cm com o piso dividido em 16 quadrados de 15 x 15 cm. Os 12 quadrados junto às paredes da caixa foram considerados periferia e os 4 demais os centrais. A rata lactante foi colocada no centro da caixa e filmada por cinco minutos. Foi avaliada a atividade ansiolítica das ratas lactantes considerando o número de cruzamentos com as quatro patas, no centro. Um aumento desse parâmetro indica uma possível atividade ansiolítica (GOMES et al., 2008). Tipicamente os animais tendem a ficar por mais tempo na periferia em comparação com a área central. Essa preferência é conhecida como tigmotaxia e o inverso leva a um efeito anti-tigmotático que pode ser observado no campo aberto e pode ser referido como uma ação ansiolítica (VALLE, 1970). Este teste também foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais analisando o número de entradas com as quatro patas na periferia e o total de cruzamentos. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

5.11 PERÍODO PÓS-DESMAME

No 22º dia de lactação os filhotes foram desmamados e suas respectivas mães sacrificadas. Somente os filhotes machos na idade adulta (8 semanas de idade) foram utilizados nos experimentos.

5.12 EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO DOS FILHOTES MACHOS ADULTOS

Na idade adulta, os filhotes MN-FN, MH-FH, MN-FH e MH-FN foram submetidos ao estresse de contenção (figura 3A e B). Este modelo de indução de estresse foi utilizado para avaliar como estes animais previamente estressados se comportam nos testes de labirinto em T elevado e no campo aberto. Antes dos testes comportamentais, os ratos foram imobilizados em um tubo cilíndrico por um período de 1 hora. Este tubo apresentava orifícios na posição em que a cabeça do rato ficou posicionada para permitir a respiração. A imobilização foi realizada em sala climatizada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ambiente silencioso, sempre no período da manhã (entre 7:00 e 12:00 horas). Amplamente utilizado como um modelo de indução do estresse, este modelo não é doloroso e não debilita o animal (BUYNITSK; MOSTOFISKY, 2009). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

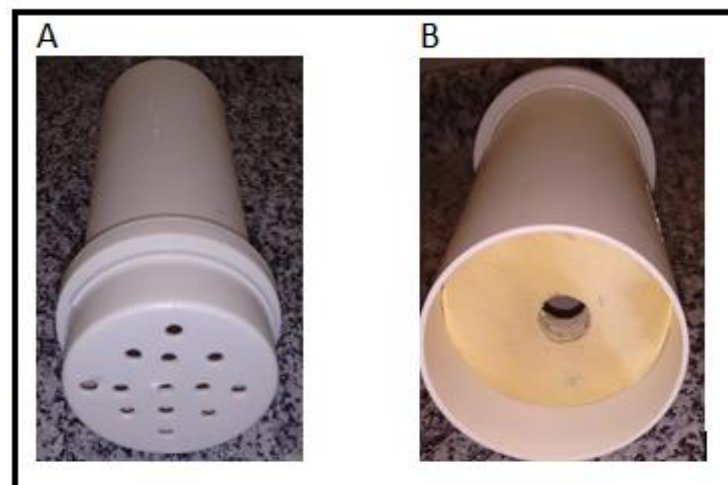


Figura 3 – Representação do aparato de estresse por contenção.

Fonte: da autora.

Nota: (A) vista anterior, (B) vista posterior.

Após o estresse de contenção, os animais foram submetidos aos aparatos de labirinto em T elevado e campo aberto como descrito abaixo.

5.13 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS ADULTOS

A seguir serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a análise comportamental dos filhotes machos adultos:

5.13.1 Labirinto em T elevado

Em um período de 24 horas antes da exposição dos ratos no labirinto em T elevado, eles passaram por um período de exposição prévia a um dos braços abertos. Para isto, foram colocadas barreiras nas entradas dos braços fechados, e eliminação de um dos braços abertos, permitindo que o rato fosse exposto a somente um dos braços abertos por um período de 30 minutos. Esta pré-exposição do animal a um dos braços abertos reduz a latência do animal para o primeiro escape (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014)

Após a exposição com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

O labirinto em T elevado (figura 4) consiste de um aparato elevado a 50 cm do chão com três braços de mesmas dimensões (50 x 10 x 0,25 cm) sendo um braço fechado perpendicular a dois braços abertos opostos. Este teste foi realizado conforme descrito previamente por Viana e colaboradores (1994) e modificado por Calixto e colaboradores (2001). 30 segundos após a indução do estresse, cada rato foi colocado no final do braço fechado e o tempo em que levou para sair com as quatro patas do braço fechado foi registrado e denominado de esquiva inibitória 1 ou latência inicial. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com intervalos de 30 segundos entre cada, obtendo-se então a esquiva inibitória 2 e 3. Após 30 segundos, cada rato foi colocado no final de um dos braços abertos e verificou-se a latência de deslocamento para o braço fechado com as quatro patas que foi considerado como o tempo de fuga. O tempo de fuga dos braços abertos também chamado de escape foi realizado por duas vezes com intervalos de 30 segundos entre o escape1 e o escape2. Após a exposição com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

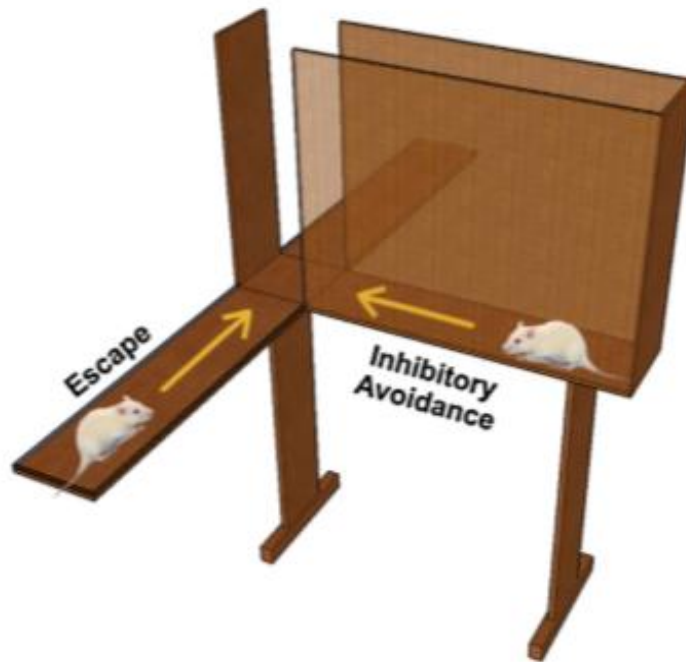


Figura 4 – Esquema representativo do labirinto em T elevado.
Fonte: ZANGROSSI; GRAEFF, 2014.

5.13.2 Campo aberto

Trinta segundos após o teste de labirinto em T elevado, os ratos foram colocadas individualmente em uma caixa de 60 x 60 cm com o piso dividido em 16 quadrados de 15 x 15 cm. Os 12 quadrados junto às paredes da caixa foram considerados periferia e os 4 demais os centrais. O ratos foram colocados no centro da caixa e filmados por cinco minutos. Foi avaliada a atividade ansiolítica dos ratos considerando o número de cruzamentos com as quatro patas, no centro. Um aumento desse parâmetro indica uma possível atividade ansiolítica (GOMES et al., 2008). Tipicamente os animais tendem a ficar por mais tempo na periferia em comparação com a área central. Essa preferência é conhecida como tigmotaxia e o inverso leva a um efeito anti-tigmotático que pode ser observado no campo aberto e pode ser referido como uma ação ansiolítica (VALLE, 1970). Este teste também foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais analisando o número de

entradas com as quatro patas na periferia e o total de cruzamentos. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

5.14 RESPOSTAS AUTONÔMICAS AO ESTRESSE

A seguir serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a análise das respostas autonômicas ao estresse:

5.14.1 Registro de parâmetros cardíacos

Durante a 8^o semana de vida, durante o período da tarde (16:00 – 18:00h) os animais (diferentes dos grupos utilizados nos testes comportamentais) foram anestesiados com tribromoetanol (TBE) 250 mg/kg i.p., e um cateter de polietileno (PE-10) de 4 cm de comprimento foi implantado na artéria femoral para aferição da pressão arterial média e frequência cardíaca. O cateter foi transpassado sob a pele e exteriorizado no dorso dos animais. Após a cirurgia, os animais receberam injeções de pentabiótico (0,02ml/animal i.p), e em seguida foram transportados para a sala de experimentos e lá permaneceram em sua caixa moradia para adaptarem ao ambiente até o dia seguinte. As respostas cardiovasculares foram avaliadas no dia seguinte logo pelo período da manhã (7:00 – 12:00h).

Os parâmetros cardiovasculares foram mensurados utilizando-se um transdutor de sinal que acoplado ao cateter arterial permitiu o processamento pelo computador (equipamento *AdInstruments*®, software *LabChart 7 Pro – PowerLab 4/30*). Os diferentes grupos experimentais MN-FN, MH-FH, MN-FH e MH-FN foram submetidos ao registro da pressão arterial média (MAP) e da frequência cardíaca (FC) em três diferentes situações:

- 1^o) Registro dos valores de MAP e FC basais e sem a situação de estresse (15 minutos);

- 2º) Registro dos valores de MAP e FC durante a situação de estresse, para isto, estes animais foram alocados no aparato de estresse de contenção por um período de 1 hora;
- 3º) Registro dos valores de MAP e FC após a situação de estresse (15 minutos).

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando um software *GraphPad* versão 5.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para comparação de duas médias foi aplicado o teste “t” de *Student*. Para comparação de três ou mais médias foi utilizado a análise de variância (ANOVA *two-way*) considerando-se os fatores dia e dieta, ou tempo (minutos) e dieta, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos no estudo:

6.1 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

A análise através da ANOVA *two-way* demonstrou que houve efeito significativo ($p < 0,0001$) no fator tratamento e no fator dia, entretanto não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,9363$). De acordo com o gráfico (A), pode-se observar que a partir do 6º dia gestação houve redução significativa ($p < 0,05$) do ganho de peso das ratas hipoproteicas em relação às ratas normoproteicas que se manteve até o 18º dia de gestação.

Com relação ao ganho de peso na lactação, a análise estatística demonstrou que houve efeito significativo ($p < 0,0001$) no fator tratamento e no fator dia, entretanto não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,9713$). No gráfico (B) pode-se observar que não houve alteração significativa do ganho de peso das ratas hipoproteicas em relação às normoproteicas.

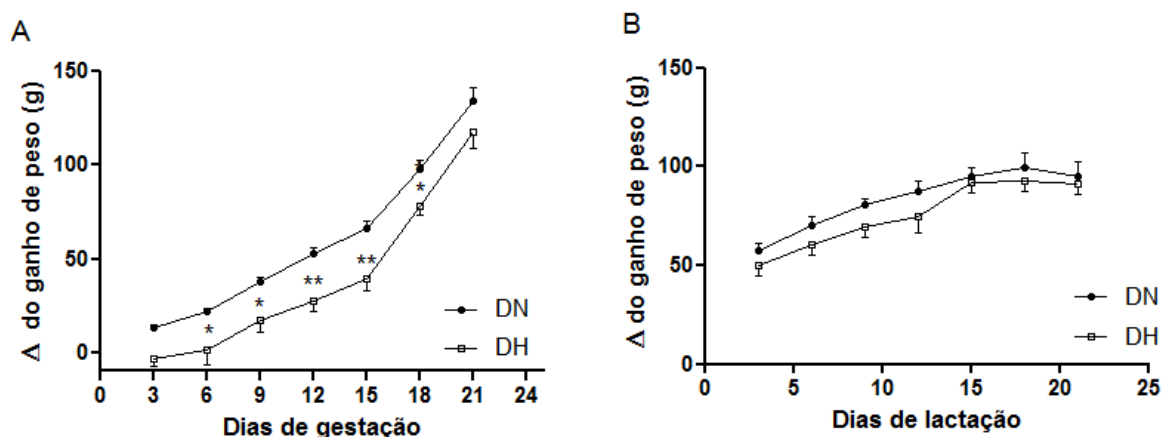


Figura 5 – Avaliação do ganho de peso das ratas ao longo de toda a gestação e lactação.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A e B). Dieta hipoproteica (DH n=8), dieta normoproteica (DN n=8). Valores expressos como média \pm SEM (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo dieta normoproteica.

6.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE RAÇÃO E DE ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

Com relação a ingestão de ração durante gestação, a análise através da ANOVA *two-way* demonstrou que houve efeito significativo no fator tratamento ($p < 0,0001$) e no fator dia ($p < 0,0004$), bem como interação entre os dois fatores ($p < 0,0454$). Segundo o pós-teste *Bonferroni* não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na ingestão de ração de ratas hipoproteicas em relação às normoproteicas durante o período de gestação, gráfico (A).

Com relação a ingestão de ração na lactação, a análise estatística demonstrou que não houve efeito significativo no fator tratamento ($p < 0,9920$), porém houve efeito significativo no fator dia ($p < 0,0001$) sem ocorrer interação entre os dois fatores ($p = 0,9768$). Segundo o pós-teste utilizado, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na ingestão de ração das ratas hipoproteicas em relação às normoproteicas durante o período de lactação, gráfico (B).

Na análise de ingestão de água durante a gestação, houve efeito significativo no fator tratamento e no fator dia ($p < 0,0001$), mas não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,4362$). A análise do pós teste permitiu demonstrar que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) na ingestão de água das ratas hipoproteicas em relação às normoproteicas durante o período de lactação, gráfico (C).

Com relação a ingestão de água durante a lactação, a análise estatística demonstrou que houve efeito significativo no fator tratamento ($p < 0,0013$) e no fator dia ($p < 0,0001$), entretanto, não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,9982$). Segundo o pós teste, pode-se observar que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) na ingestão de água das ratas hipoproteicas em relação às normoproteicas durante o período de lactação, gráfico (D).

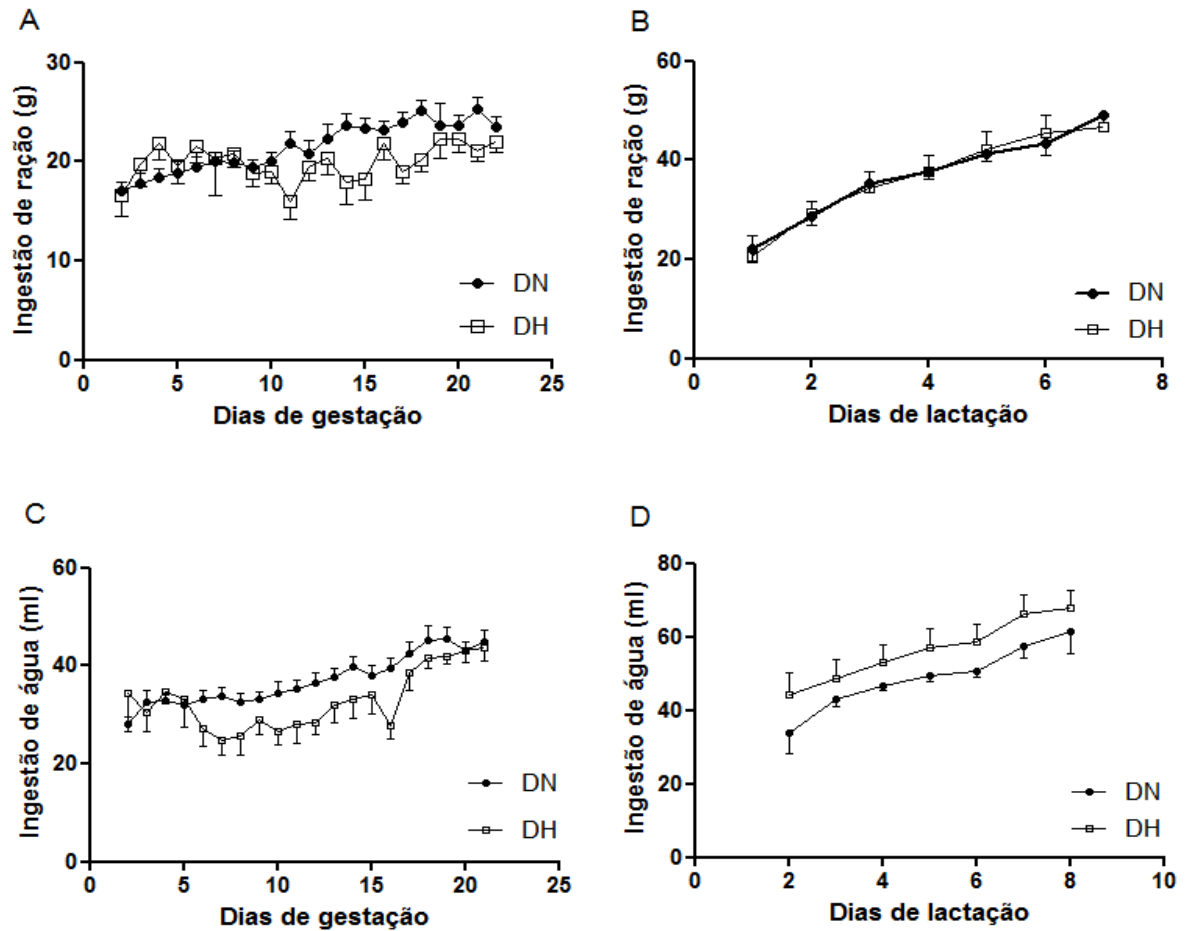


Figura 6 – Avaliação da ingestão de ração e de água de ratas gestantes e lactantes.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A – D). Dieta hipoproteica (DH n=8), dieta normoproteica (DN n=8). Valores expressos como média \pm SEM (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

6.3 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA

A análise através da ANOVA *two-way* mostrou que houve efeito significativo no fator tratamento e no fator dia ($p < 0,0001$), mas não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,0590$). Segundo o pós teste *Bonferroni*, pode-se observar que houve redução significativa ($p < 0,05$) do ganho de peso da ninhada hipoproteica em relação a ninhada normoproteica a partir do 11^o DL até o 20^o DL.

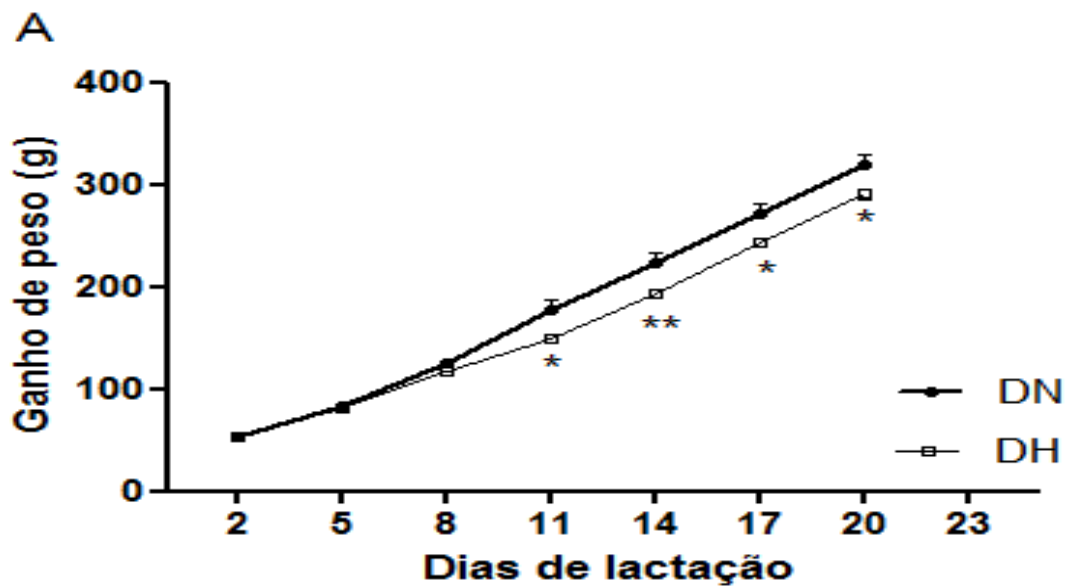


Figura 7 – Avaliação do ganho de peso da ninhada ao longo dos 21 dias de lactação.

Fonte: da autora.

Nota: Filhotes de mães de dieta hipoproteica (DH n=8), filhotes de mães dieta normoproteica (DN n=8). Valores expressos como média \pm SEM (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo dieta normoproteica (DN).

6.4 AVALIAÇÃO DO CUIDADO MATERNO EM RATAS LACTANTES

A seguir serão apresentados os resultados referentes ao cuidado materno das ratas lactantes:

6.4.1 Avaliação do comportamento materno na primeira semana de lactação

A figura 8 mostra o comportamento materno total (CMT), ou seja, análise somente dos parâmetros maternos: cifose, lambendo *pups*, sobre *pups*, posição passiva, forrageando e *self-grooming* de mães MH-FH, MN-FH, MH-FN (comparadas com seu respectivo controle) por dia, desde 2º até 8º DL. Os dados foram obtidos a partir da porcentagem de observações por dia, calculando-se a porcentagem de observações das quatro análises diárias.

A análise através do teste “t” de *Student* mostrou que não houve diferença significativa do CMT de mães MH-FH em relação a mães MN-FN ao longo do 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º e 8º DL, gráficos: A, D, G, J, M, P e S, respectivamente.

Mães MN-FH quando comparadas com mães MN-FN não apresentaram diferença significativa do CMT ao longo do 2º, 4º, 5º, 6º, 7º e 8º DL; gráficos: B, H, K, N, Q e T, com exceção do 3º DL, gráfico (E), onde observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) do CMT de mães MN-FH quando comparadas com mães MN-FN.

Mães MH-FN quando comparadas com mães MH-FH também não apresentaram diferenças significativas no CMT como pode ser observado nos gráficos C, F, I, L, O, R e U.

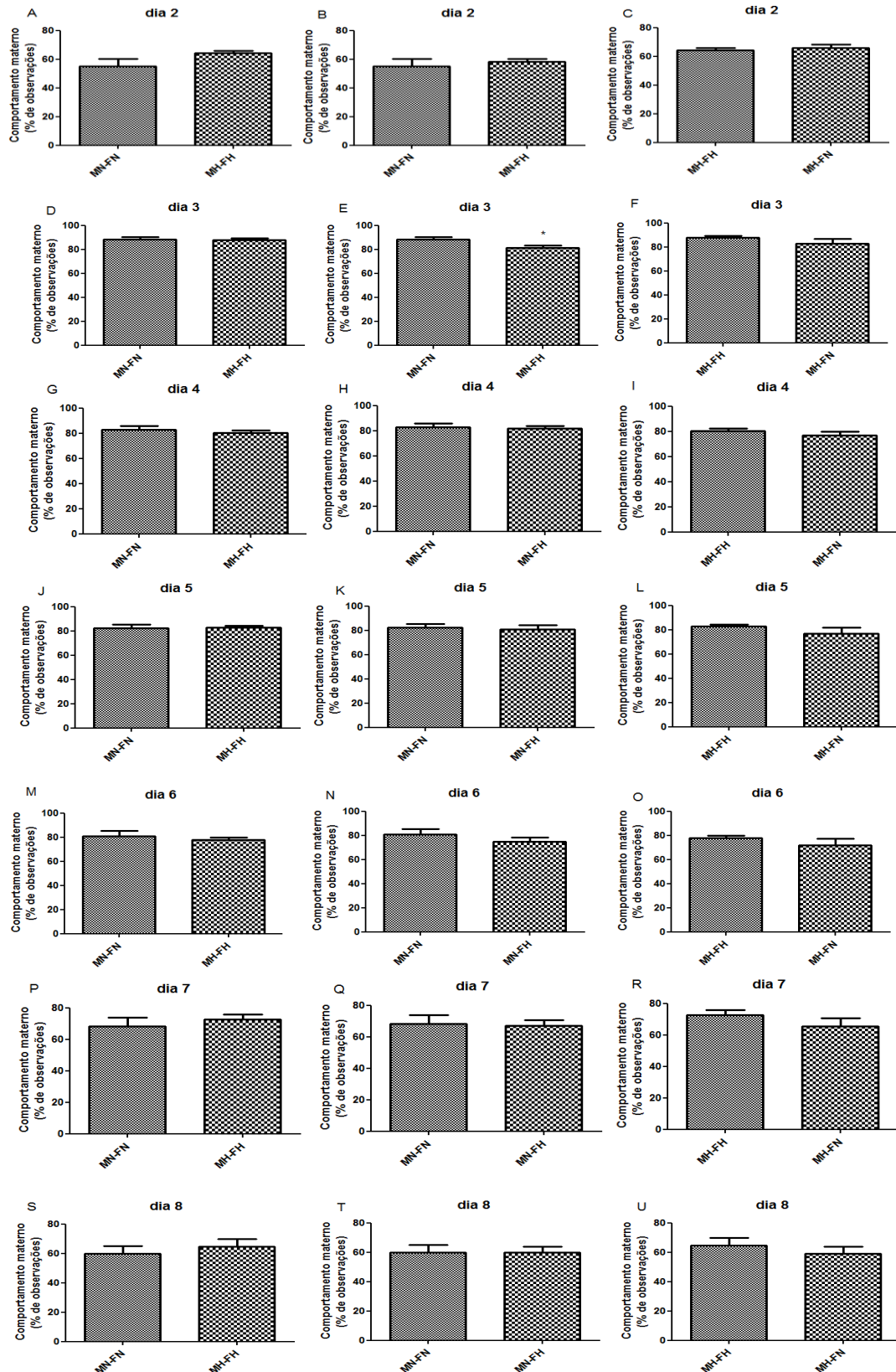


Figura 8 – Avaliação do comportamento materno total.

Fonte: da autora.

Nota: (MN-FN e MH-FH, n=10); (MN-FH e MH-FN, n=8). Porcentagem do CMT do 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º e 8º DL, gráficos A - U. Valores expressos como média ± SEM (Teste *t* de Student). * $P < 0,05$, quando comparado com seu respectivo controle.

A figura 9 mostra o comportamento não materno total (CñMT), ou seja, análise dos parâmetros não maternais: alimentando, explorando e não explorando de mães MH-FH, MN-FH, MH-FN (comparadas com seu respectivo controle) por dia, desde 2º até 8º DL.

A análise através do teste “t” de *Student* demonstrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) do CñMT de mães MH-FH quando comparadas com mães MN-FN como pode ser observado nos gráficos A, D, G, J, M, P e S.

Mães MN-FH quando comparadas com mães MN-FN não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) do CñMT, gráficos B, H, K, N, Q e T, com exceção do 3º DL, gráfico (E), onde observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) do CñMT de mães MN-FH em relação a mães MN-FN.

Mães MH-FN quando comparadas com mães MH-FH não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no CñMT, gráficos C, F, I, L, O, R e U.

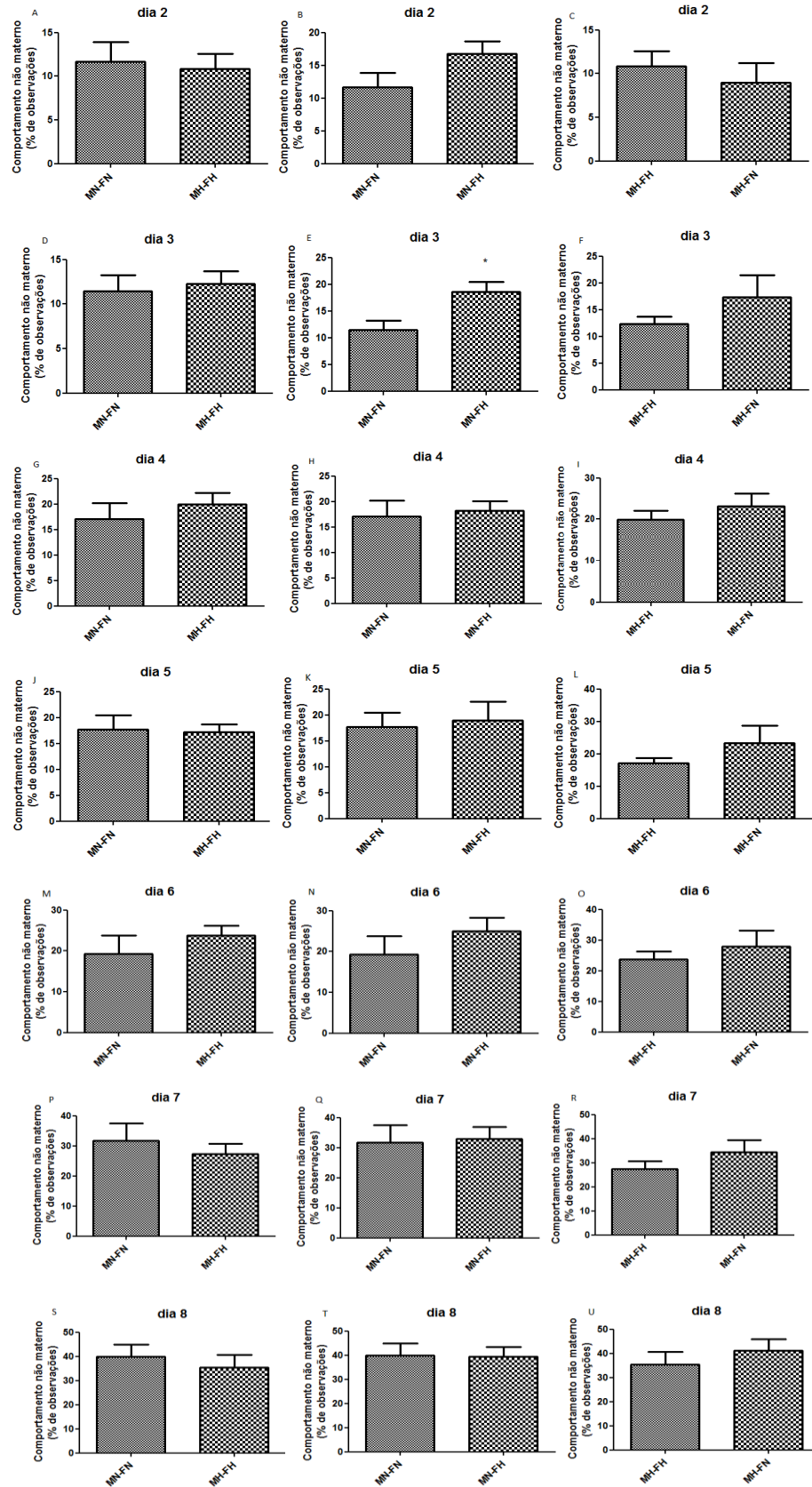


Figura 9 – Avaliação do comportamento não materno total.

Fonte: da autora.

Nota: (MN-FN e MH-FH, n=10); (MN-FH e MH-FN, n=8). Porcentagem do CñMT do 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º e 8º dia de lactação, gráficos A – U. Valores expressos como média ± SEM (Teste de Student). * P < 0,05, quando comparado com seu respectivo controle.

A figura 10 mostra a porcentagem dos parâmetros maternos: cifose, lambendo *pups*, sobre *pups*, posição passiva, construindo o ninho e *self-grooming* de mães MH-FH, MN-FH, MH-FN (comparadas com seu respectivo controle) na primeira semana de lactação (2º - 8º dia de lactação). Os dados foram obtidos a partir do somatório das observações das quatro análises diárias na primeira semana e calculando-se a porcentagem de observações.

A análise através do teste “t” de *Student* mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros de cifose, lambendo os *pups*, sobre os *pups*, passiva, construindo o ninho e *self-grooming* de mães MH-FH em comparação com mães MN-FN, gráficos A, D, G, J, M e P.

Os parâmetros de cifose, lambendo os *pups*, passiva, construindo o ninho e *self-grooming* também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em mães MN-FH em relação a mães MN-FN, gráficos B, E, K, N, Q. Já o parâmetro sobre os *pups* apresentou redução significativa ($p < 0,01$) em mães MN-FH em relação a mães MN-FN, gráfico H.

Quando comparadas com mães MH-FH, as mães MH-FN não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros de cifose, lambendo *pups*, sobre *pups*, posição passiva, construindo o ninho e *self-grooming* como observado nos gráficos C, F, I, L, O e R.

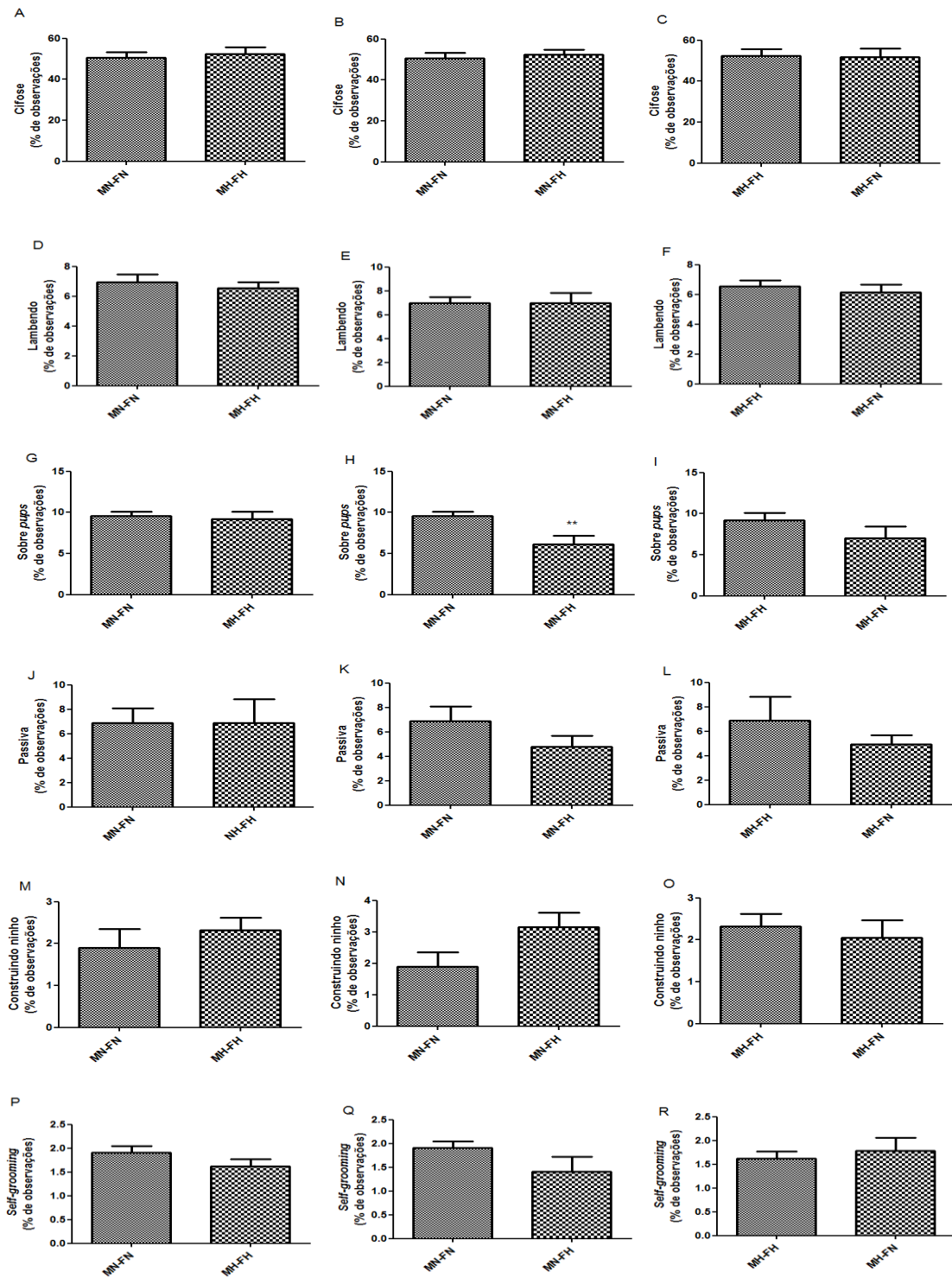


Figura 10 – Avaliação dos parâmetros maternos.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A–R). (MN-FN e MH-FH, n=10); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média ± SEM (Teste *t* de Student). **p < 0,01, quando comparado com seu respectivo controle.

A figura 11 mostra a porcentagem dos parâmetros não maternos: alimentando-se, explorando e não explorando de mães MH-FH, MN-FH, MH-FN (comparadas com seu respectivo controle) na primeira semana de lactação (2^o - 8^o dia de lactação).

A análise teste “t” de *Student* demonstrou que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros não maternos de alimentação, explorando e não explorando de mães MH-FH em relação a mães MN-FN como observado nos gráficos A, D e G.

Mães MN-FH quando comparadas com mães MN-FN não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros explorando e não explorando, gráficos E e H. Entretanto, como demonstrado no gráfico (B), mães MN-FH apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) do parâmetro de alimentação em relação às mães MN-FN.

Da mesma forma, mães MH-FN não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) dos parâmetros de alimentação, explorando e não explorando em relação às mães MH-FH como demonstrado nos gráficos C, F e I.

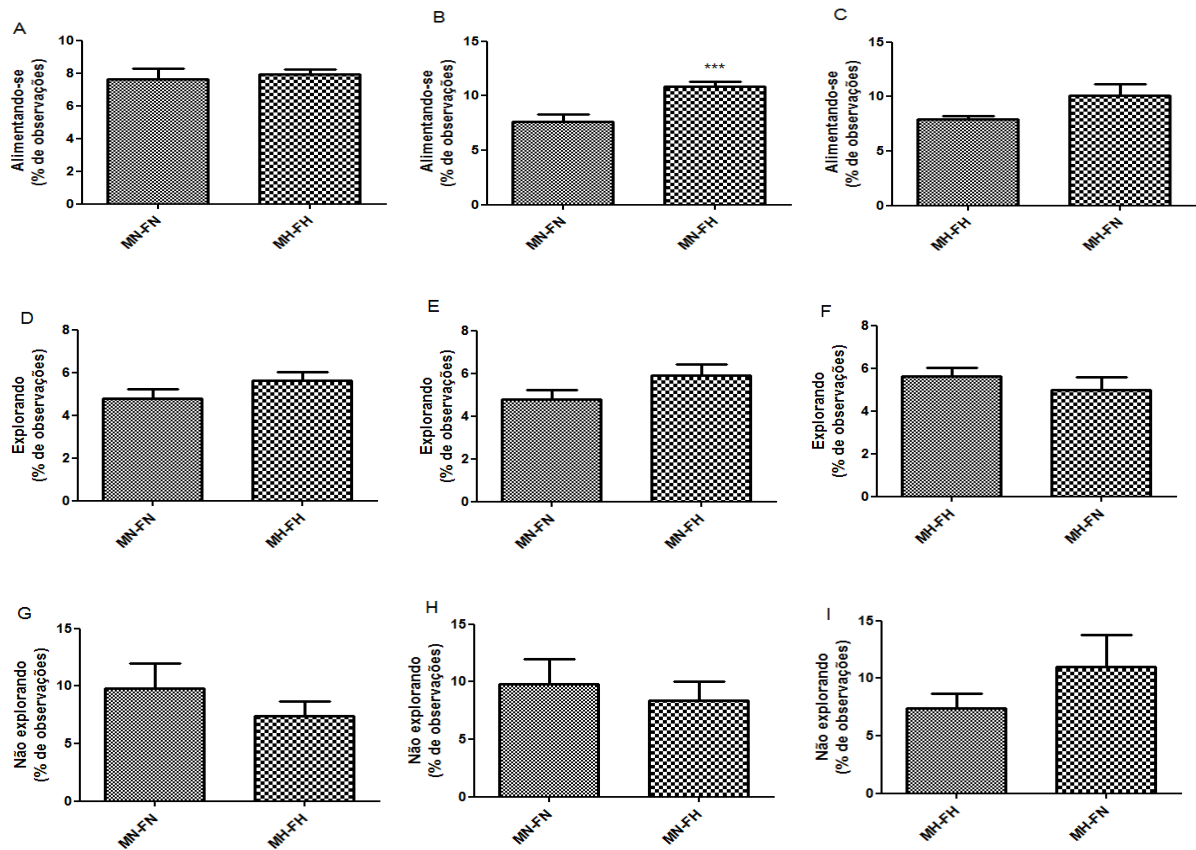


Figura 11 – Avaliação dos parâmetros não maternos.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A-I). (MN-FN e MH-FH, n=10); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de Student). *** $p < 0,001$, quando comparado com seu respectivo controle.

6.4.2 Análise do comportamento materno após separação maternal

Na análise de mães MH-FH, quando comparadas às mães MN-FN, a ANOVA *two-way* mostrou que há efeitos significativos no fator tratamento e no fator tempo ($p < 0,0001$), entretanto, não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,7691$). Segundo a análise do pós teste, pode-se observar que as mães MH-FH quando comparadas às mães MN-FN, apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) do tempo para construir o ninho como observado no gráfico (A).

Na análise de mães MN-FH, quando comparadas às mães MN-FN, houve efeito significativo no fator tratamento ($p < 0,01$) e no fator tempo ($p < 0,0001$), sem ocorrer interação entre os dois fatores ($p = 0,7903$). Na análise do pós teste, mães MN-FH, quando comparadas com mães MN-FN, não apresentaram alterações

significativas ($p > 0,05$) no tempo de construção do ninho, como pode ser observado no gráfico (B).

Com relação as mães MH-FN, quando comparadas às mães MH-FH, não houve efeito significativo no fator tratamento ($p = 0,1347$), porém houve efeito significativo no fator tempo ($p < 0,0001$) e não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,7700$). Na análise do pós teste, mães MH-FN, quando comparadas com mães MH-FH, não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) no tempo de construção do ninho, como pode ser observado no gráfico (C).

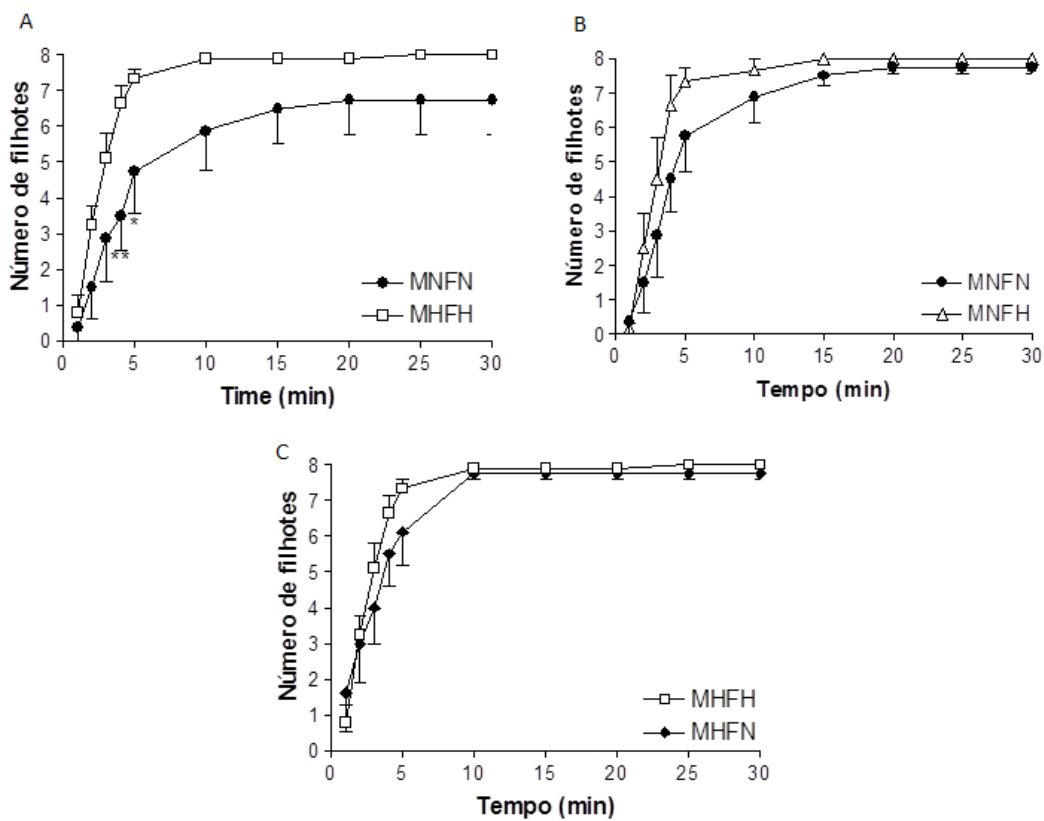


Figura 12 – Avaliação da construção do ninho.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A–C). (MN-FN e MH-FH, $n=8$); (MN-FH e MH-FN, $n=8$). Valores expressos como média \pm SEM (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; quando comparado com seu respectivo controle.

A figura 13 mostra a avaliação dos parâmetros maternos: cifose, lambendo e construindo o ninho e tempo *other* de mães MH-FH, MN-FH, MH-FN (comparadas com seu respectivo controle). A análise teste “t” de *Student* demonstrou que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros de cifose, lambendo e construindo o ninho e *other* de mães MH-FH em relação a mães MN-FN como observado nos gráficos A, D, G e J.

Da mesma forma, mães MN-FH quando comparadas com mães MN-FN não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) de nenhum dos parâmetros analisados como observado nos gráficos B, E, H e K.

Mães MH-FN quando comparadas com mães MH-FH não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros de cifose, lambendo e construindo o ninho como observado nos gráficos C, F e I. Entretanto, essas mães apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) do tempo em posição *other* em comparação com seu respectivo controle como observado no gráfico (L).

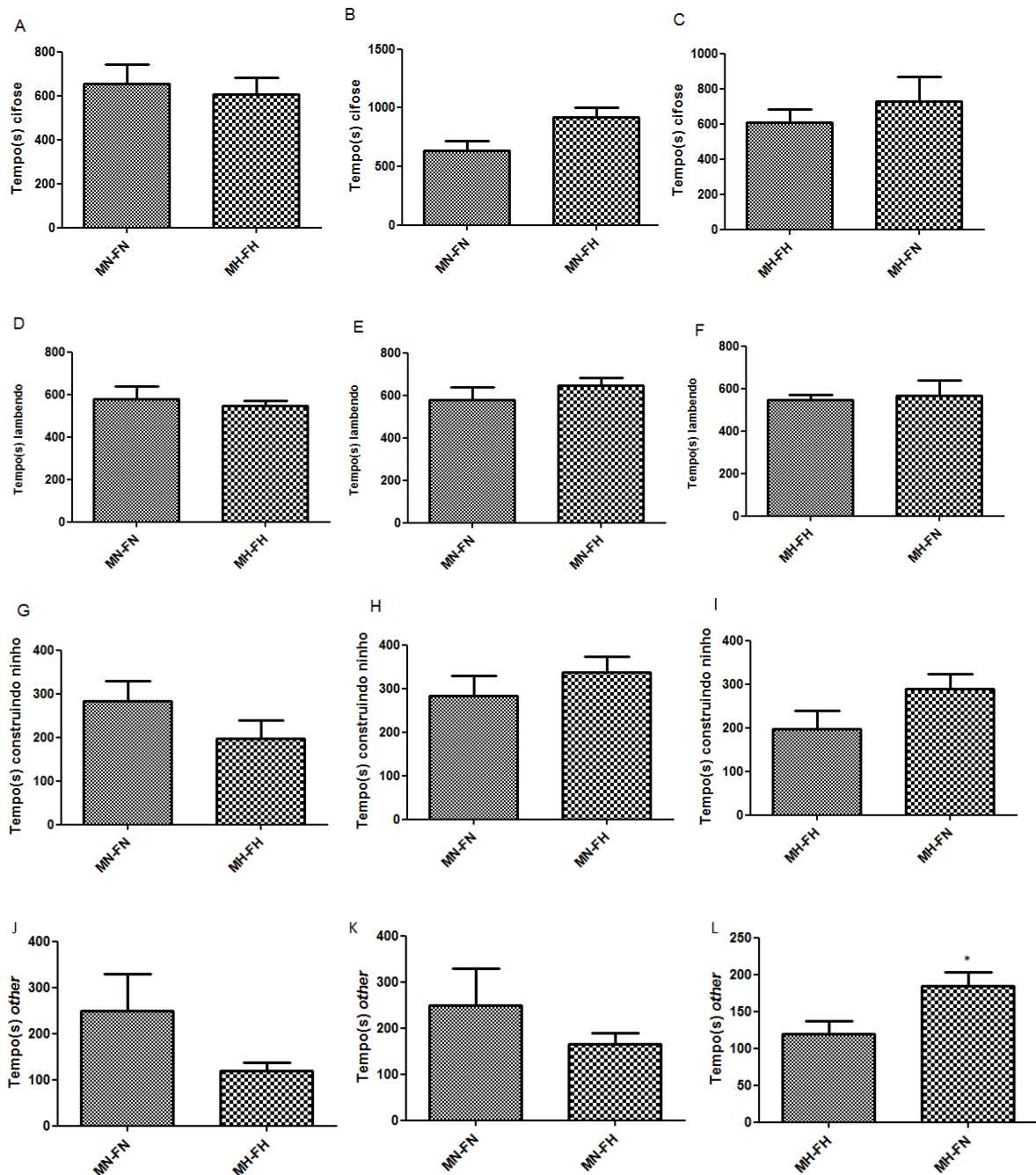


Figura 13 – Avaliação dos parâmetros maternos.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A–L). (MN-FN e MH-FH, n=8); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de Student). * $p < 0,05$ quando comparado com seu respectivo controle.

Na figura 14, mães MH-FH e mães MH-FN não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no tempo(s) *off* em comparação com o seu respectivo controle como observado nos gráficos D e F respectivamente. Já mães MN-FH

apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) do tempo *off* em comparação com o seu controle como observado no gráfico (E).

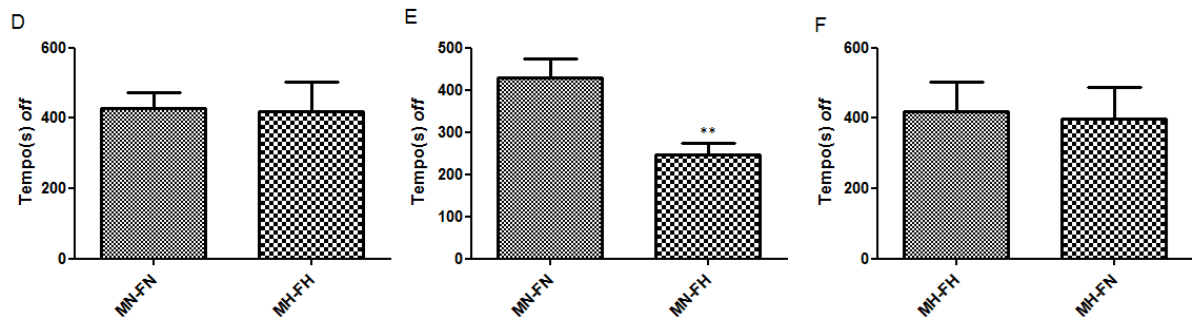


Figura 14 – Avaliação de parâmetros não maternos.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (D–F). (MN-FN e MH-FH, $n=8$); (MN-FH e MH-FN, $n=8$). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de Student); ** $p < 0,01$ quando comparado com seu respectivo controle.

6.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO – RATAS LACTANTES

A figura 15 demonstra o desempenho de mães MH-FH, MN-FH e MH-FN (comparadas com seu respectivo controle) no labirinto em cruz elevado.

Pode-se observar que mães MH-FH quando comparadas com mães MN-FN não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros de número de entradas nos braços fechados, tempo de permanência nos braços fechados, número de entradas nos braços abertos e tempo de permanência nos braços abertos como observado nos gráficos A, D, G e J.

Da mesma forma, mães MN-FH quando comparadas com mães MN-FN não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros analisados como observado nos gráficos B, E, H e K.

Mães MH-FN quando comparadas com mães MH-FH não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros de número de entradas nos braços fechados e tempo de permanência nos braços fechados, gráficos C e F. Entretanto, estas mães apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) do número de entradas nos braços abertos e um aumento significativo ($p < 0,001$) do tempo de

permanência nos braços abertos como observado nos gráficos I e L, respectivamente.

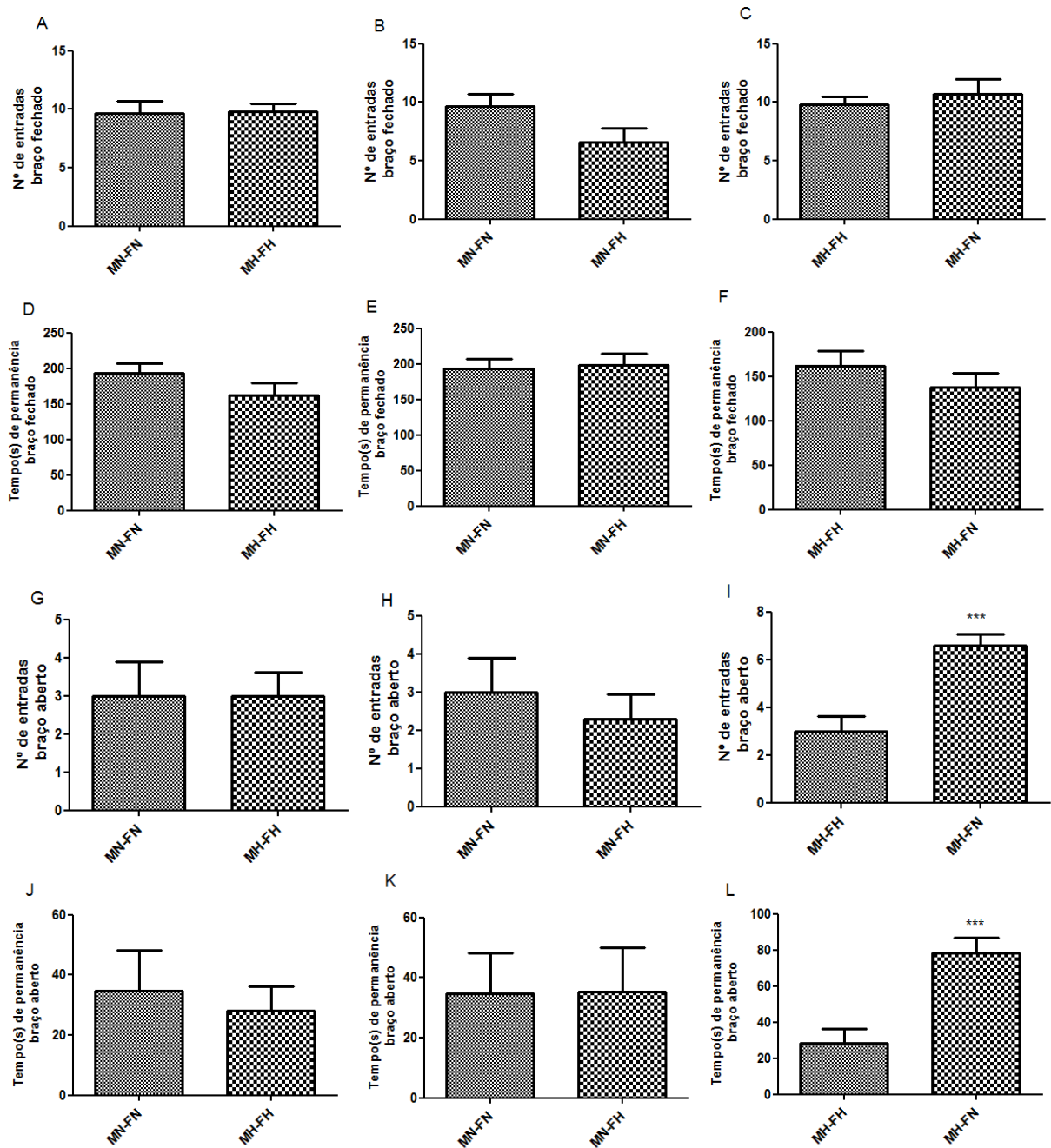


Figura 15 – Teste no labirinto em cruz elevado.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A–L). (MN-FN e MH-FH, n=8); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média ± SEM (Teste *t* de Student). *** $p < 0,001$ quando comparado com o seu respectivo controle.

6.6 CAMPO ABERTO – RATAS LACTANTES

A figura 16 demonstra o desempenho de mães MH-FH, MN-FH e MH-FN (comparadas com seu respectivo controle) no teste de campo aberto.

Mães MH-FH quando comparadas com mães MN-FN não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como observado nos gráficos A, D, G e J, respectivamente.

Mães MN-FH quando comparadas com mães MN-FN também não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como observado nos gráficos B, E, H e K, respectivamente.

Da mesma forma, mães MH-FN quando comparadas com mães MH-FH não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como observado nos gráficos C, F, I e L respectivamente.

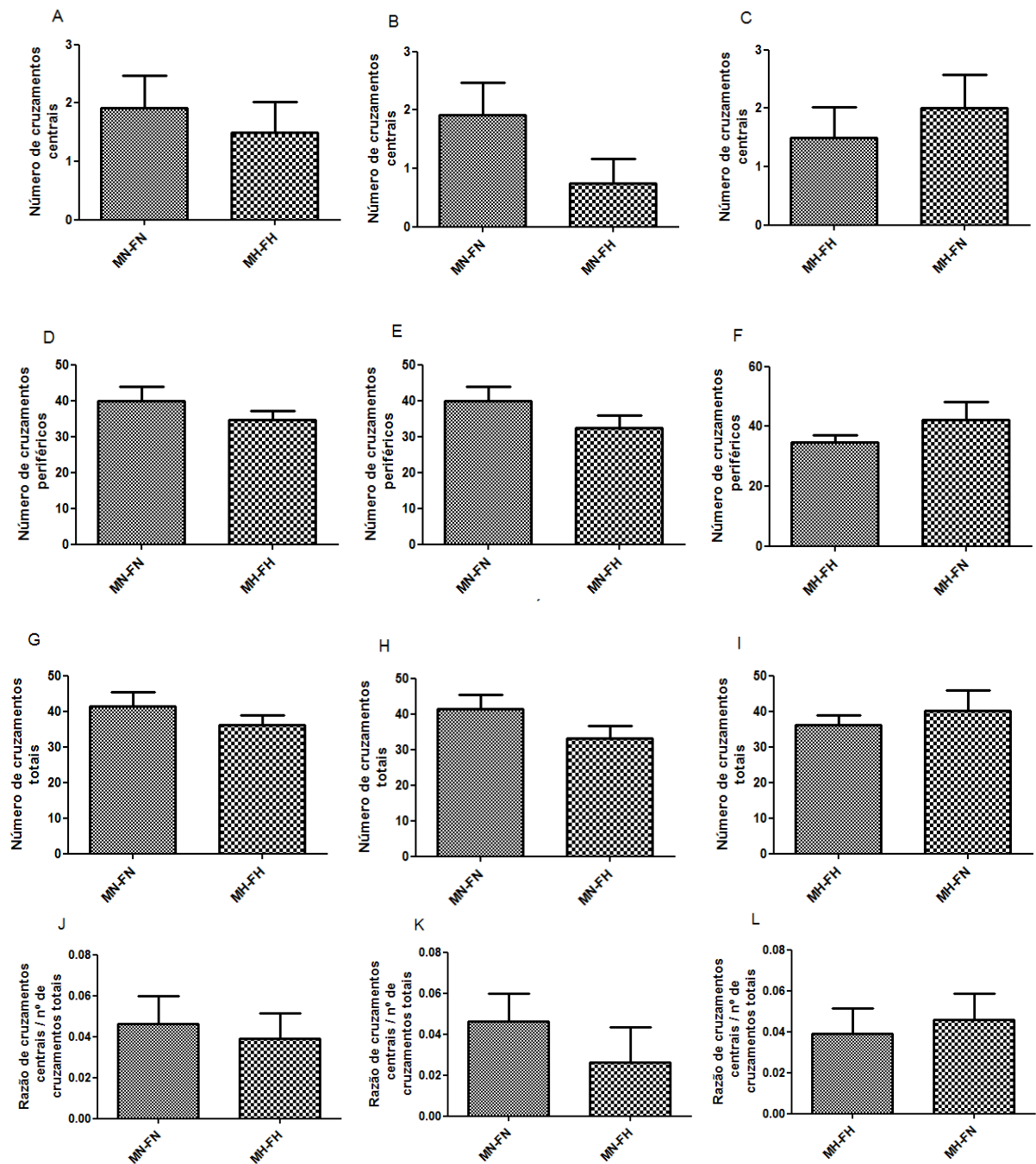


Figura 16 – Teste de campo aberto.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A–L). (MN-FN e MH-FH, n=8); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de Student).

6.7 LABIRINTO EM T ELEVADO – FILHOTES NÃO ESTRESSADOS

A figura 17 demonstra o desempenho dos filhotes MH-FH, MN-FH e MH-FN (comparados com seu respectivo controle), que não foram previamente submetidos ao estresse de contenção, no teste de labirinto em T elevado.

Pode-se observar que filhotes MH-FH quando comparados com filhotes MH-FH apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) do tempo de esquiava 1 e do tempo de esquiava 2 como observado nos gráficos A e D respectivamente, entretanto, não houve alteração significativa ($p > 0,05$) do tempo de esquiava 3 como observado no gráfico G. Com relação ao tempo de escape 1 e 2, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) como observado nos gráficos J e M, respectivamente.

Filhotes MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) do tempo de esquiava 1, tempo de esquiava 2, tempo de esquiava 3, tempo de escape 1 e tempo de escape 2 como observado nos gráficos B, E, H, K e N, respectivamente.

Filhotes MH-FN quando comparados com filhotes MH-FH não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) do tempo de esquiava 1 e tempo de esquiava 3, entretanto, observou-se redução significativa ($p < 0,01$) do tempo de esquiava 2 como observado nos gráficos C, I e F respectivamente. Com relação ao tempo de escape 1 e tempo de escape 2, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) como observado nos gráficos L e O, respectivamente.

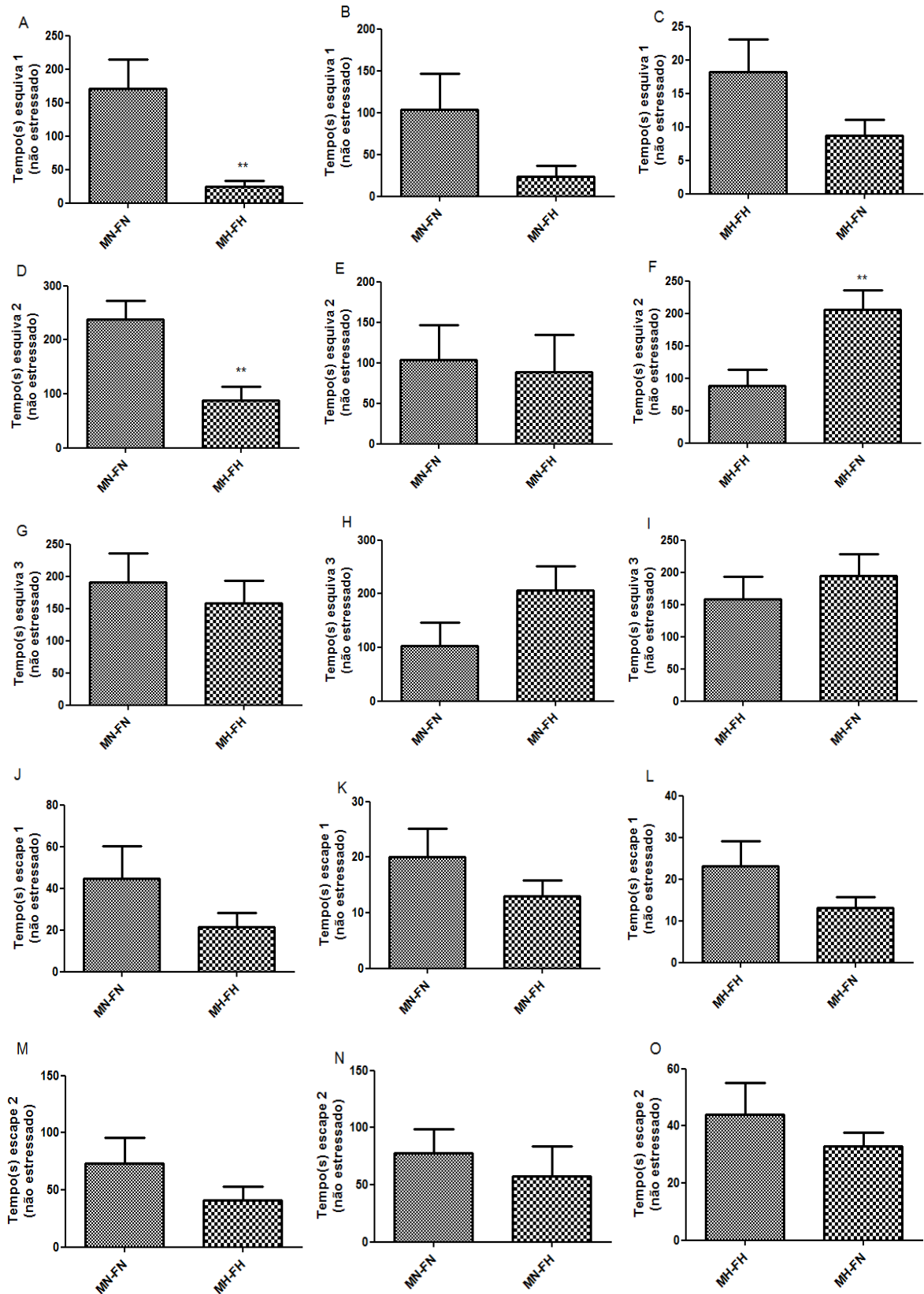


Figura 17 – Teste do labirinto em T elevado dos filhotes que não foram submetidos ao estresse de contenção.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A-O); (MN-FN e MH-FH, n=8); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de *Student*). ** $p < 0,01$ quando comparado com seu respectivo controle.

6.8 CAMPO ABERTO- FILHOTES NÃO ESTRESSADOS

Na figura 18, a avaliação do teste de campo aberto demonstrou que filhotes MH-FH quando comparados com filhotes MN-FN não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como observado nos gráficos A, D, G e J, respectivamente.

Filhotes MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos e número de cruzamentos totais como observado nos gráficos B, E e H respectivamente. Entretanto, estes filhotes apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais quando comparado com seu respectivo controle, como observado no gráfico (K).

Com relação aos filhotes MH-FN, quando comparados com filhotes MH-FH, estes não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como observado nos gráficos C, F, I e L, respectivamente.

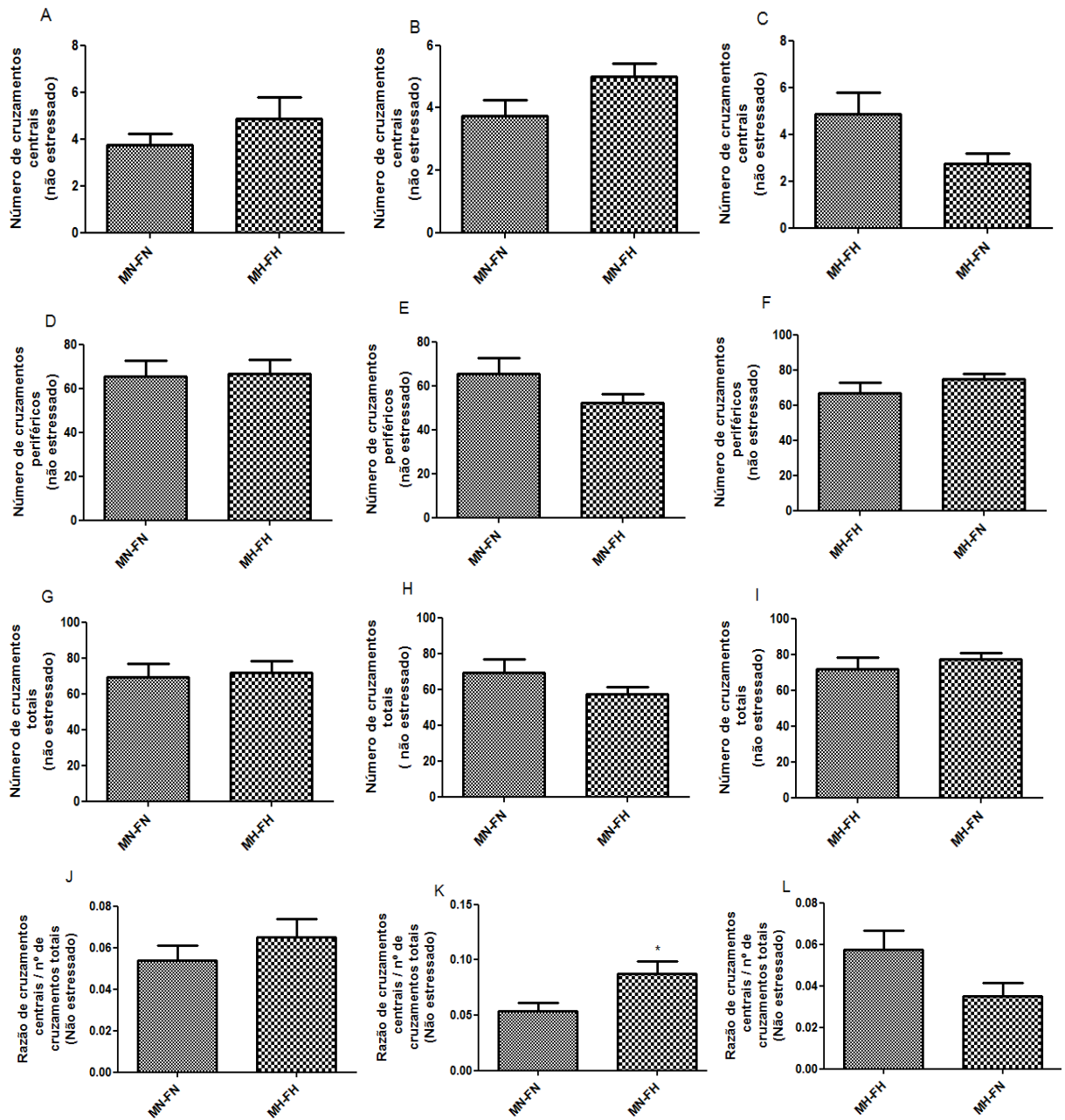


Figura 18 – Teste do campo aberto dos filhotes machos que não foram submetidos ao estresse de contenção.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A-L); (MN-FN e MH-FH, n=8); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de Student). * $p < 0,05$ quando comparado com seu respectivo controle.

6.9 LABIRINTO EM T ELEVADO – FILHOTES ESTRESSADOS

A figura 19 demonstra o desempenho dos filhotes MH-FH, MN-FH e MH-FN (comparados com seu respectivo controle), previamente submetidos ao estresse de contenção, no teste de labirinto em T elevado.

Filhotes MH-FH quando comparados com filhotes MN-FN apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) do tempo de esquiva 1 e do tempo de esquiva 2 ($p > 0,05$), entretanto não apresentaram alterações significativas no tempo de esquiva 3 como observado nos gráficos A, D e G respectivamente. Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) no tempo de escape 1 e no tempo de escape 2 como observado nos gráficos J e M, respectivamente.

Filhotes MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) do tempo de esquiva 1, entretanto, nos tempos de esquiva 2 e 3 não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) como observado nos gráficos B, E e H respectivamente. Como observado no gráfico k, estes filhotes apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de escape 1, já o tempo de escape 2 não apresentou alteração significativa ($p > 0,05$), como observado no gráfico (N).

Com relação aos filhotes MH-FN, quando comparados com filhotes MH-FH, estes apresentaram aumento significativo ($p < 0,01$) no tempo de esquiva 1 e um aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de esquiva 2, sem alteração significativa ($p > 0,05$) no tempo de esquiva 3 como pode ser observado nos gráficos C, F e I respectivamente. Pode-se observar que houve redução significativa ($p < 0,05$) do tempo de escape 1, entretanto, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) no tempo de escape 2 como pode ser observado nos gráficos L e O, respectivamente.

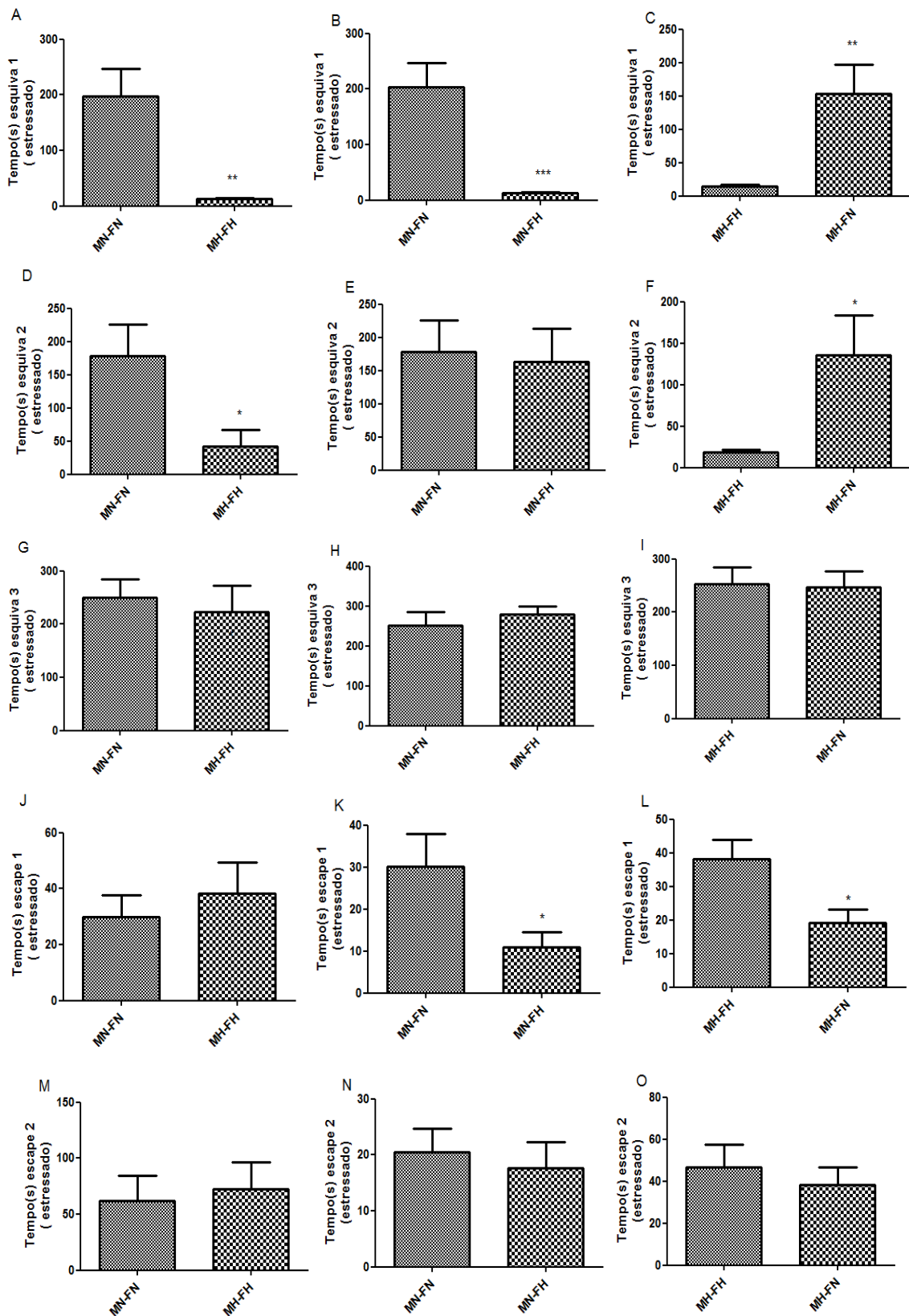


Figura 19 – Teste do labirinto em T elevado em ratos machos previamente submetidos ao estresse de contenção.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A-O); (MN-FN e MH-FH, n=8); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de Student). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com seu respectivo controle.

6.10 CAMPO ABERTO – FILHOTES ESTRESSADOS

Na figura 20 a avaliação do teste de campo aberto demonstrou que filhotes MH-FH quando comparados com filhotes MN-FN não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como pode ser observado nos gráficos A, D, G e J, respectivamente.

Da mesma forma, filhotes MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN, não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como observado nos gráficos B, E, H e K, respectivamente.

Com relação aos filhotes MH-FN, quando comparados com filhotes MH-FH, estes também não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros de número de cruzamentos centrais, número de cruzamentos periféricos, número de cruzamentos totais e razão de cruzamentos centrais/número de cruzamentos totais como observado nos gráficos C, F, I e L, respectivamente.

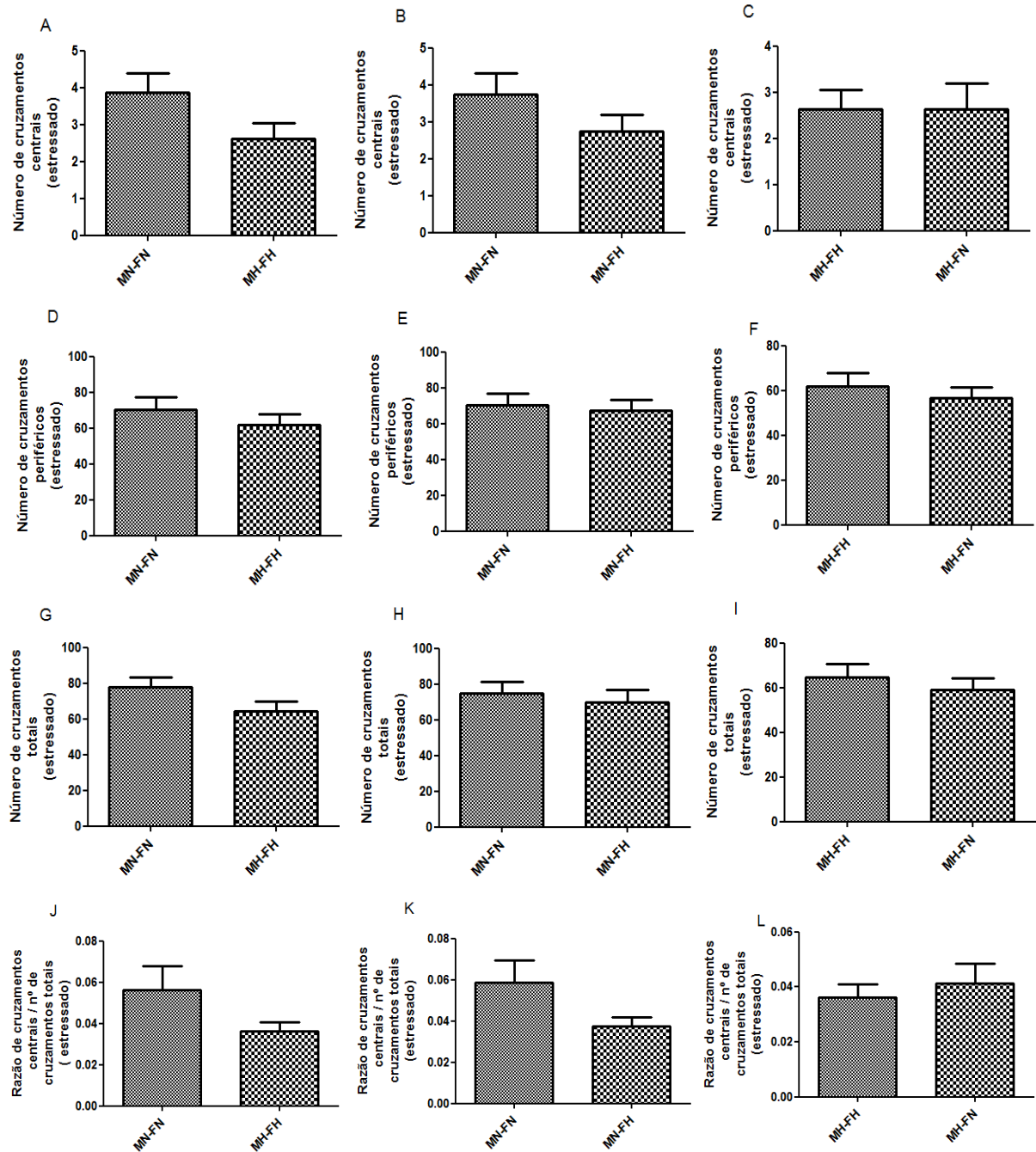


Figura 20 – Teste do campo aberto em filhotes machos previamente submetidos ao estresse de contenção.

Fonte: da autora.

Nota: Gráficos (A-L); (MN-FN e MH-FH, n=8); (MN-FH e MH-FN, n=8). Valores expressos como média \pm SEM (Teste *t* de Student).

6.11 RESPOSTAS AUTONÔMICAS AO ESTRESSE

Com relação a pressão arterial média (PAM) dos filhotes MH-FH, a análise através da ANOVA *two-way* demonstrou que não houve efeito significativo no fator tratamento ($p = 0,7901$), entretanto houve efeito significativo no fator tempo ($p < 0,0001$) e não houve interação entre os dois fatores ($p = 5301$). Segundo a análise do pós teste, pode-se observar que filhotes MH-FH quando comparados com filhotes MN-FN, não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) da PAM como pode ser observado no gráficos (A).

Na análise da frequência cardíaca (FC) dos filhotes MH-FH, não houve efeito significativo no fator tratamento ($p = 0,5611$), porém houve efeito significativo no fator tempo ($p < 0,0001$) e não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,2003$). Segundo a análise do pós teste, pode-se observar que filhotes MH-FH quando comparados com filhotes MN-FN, não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) da FC como pode ser observado no gráfico (B).

A análise da PAM dos filhotes MN-FH demonstrou que houve efeito significativo ($p < 0,0001$) no fator tratamento e no fator dieta e ainda houve interação entre os dois fatores ($p < 0,0001$). A análise do pós teste demonstrou que filhotes MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN apresentaram redução significativa ($p < 0,0001$) da PAM como pode ser observado no gráfico (C).

Na análise da FC dos filhotes MN-FH demonstrou que não houve efeito significativo no fator tratamento ($p = 0,1892$), porém houve efeito significativo no fator tempo ($p < 0,0001$) e não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,3461$). A análise do pós teste demonstrou que filhotes MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN não apresentam alterações significativas da FC como pode ser observado no gráfico (D).

Com relação a análise da PAM dos filhotes MH-FN, não houve efeito significativo no fator tratamento ($p = 0,9054$), porém houve efeito significativo no fator tempo ($p < 0,0001$), e não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,9910$). A análise do pós teste demonstrou que filhotes MH-FN quando comparados com filhotes MH-FH não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) da PAM como pode ser observado no gráfico (E).

A análise da FC dos filhotes MH-FN, demonstrou que não houve efeito significativo no fator tratamento ($p = 0,9927$), porém houve efeito significativo no fator tempo ($p < 0,0001$) e não houve interação entre os dois fatores ($p = 0,7117$). A análise do pós teste demonstrou que filhotes MH-FN quando comparados com filhotes MH-FH não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) da FC como pode ser observado no gráfico (F).

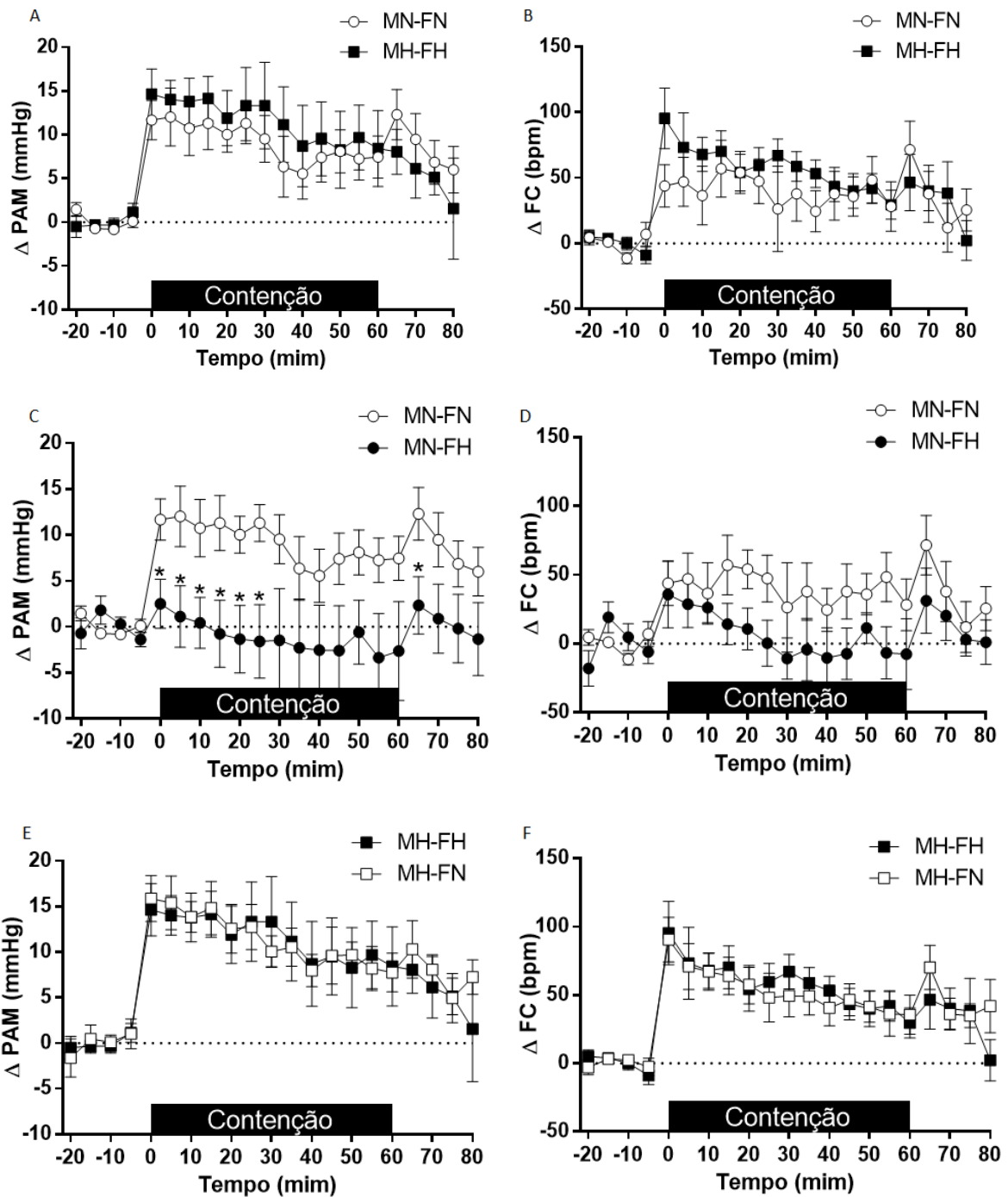


Figura 21 – Avaliação das da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos machos adultos antes, durante e após o estresse de contenção.

Fonte: da autora.

Nota: Gráfico (A) PAM em filhotes MH-FH $n=6$, gráfico (B) FC em filhotes MH-FH $n=6$, gráfico (C) PAM em filhotes MN-FH = 6, gráfico (D) FC em filhotes MN-FH $n=6$, gráfico (E) PAM em filhotes MH-FN $n=6$, (F) FC em filhotes MH-FN $n=6$. Valores expressos como média \pm SEM (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*). * $p < 0,05$ quando comparado com seu respectivo controle.

6.12 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO

Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos no estudo

Ganho de peso das ratas atas gestantes e lactantes	Ratas gestantes: Redução significativa do ganho de peso do 6º ao 18º DG; Ratas lactantes: não houve alteração significativa.
Ingestão de ração e de água das ratas gestantes e lactantes	Não alterou
CM por dia	Mães MN-FH comparadas com MN-FN: aumento do CM e diminuição do CñMT no 3º DL.
CM por semana	Mães MN-FH comparadas com MN-FN: redução do parâmetro sobre os <i>pups</i> , e aumento do parâmetro alimentando-se.
CM após separação maternal	Mães MH-FH comparadas com MN-FN: redução do tempo para construção do ninho; Mães MH-FN comparadas com mães MH-FH: aumento do parâmetro tempo <i>other</i> ; Mães MN-FH comparadas com mães MN-FN: redução do parâmetro tempo <i>off</i> .
Labirinto em cruz elevado – Ratas lactantes	Mães MH-FN comparadas com mães MH-FH: aumento do número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos.
Campo aberto – Ratas lactantes	Não alterou

Tabela 3 – Continuação

<p>Labirinto em T elevado – Filhotes não estressados</p>	<p>Filhotes MH-FH comparados com MN-FN: redução do tempo de esquiva inibitória 1 e 2;</p> <p>Filhotes MH-FN comparados com MH-FH: aumento do tempo de esquiva inibitória 2.</p>
<p>Campo aberto – Filhotes não estressados</p>	<p>Filhotes MN-FH comparados com MN-FN: aumento do parâmetro número de entradas no centro/número total de entradas.</p>
<p>Labirinto em T elevado – Filhotes estressados</p>	<p>Filhotes MH-FH comparados com MN-FN: redução do tempo de esquiva inibitória 1 e 2;</p> <p>Filhotes MN-FH comparados com MN-FN: redução do tempo de esquiva inibitória 1 e redução do tempo de escape 1;</p> <p>Filhotes MH-FN comparados com MH-FH: Aumento do tempo de esquiva inibitória 1 e 2 e redução do escape 1.</p>
<p>Respostas autonômicas ao estresse</p>	<p>Filhotes MN-FH comparados com MN-FN: redução da pressão arterial média.</p>

7 DISCUSSÃO

A seguir será apresentada a discussão dos resultados obtidos no estudo:

7.1 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DA INGESTÃO DE RAÇÃO E DE ÁGUA DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

A restrição proteica iniciada no 0 DG e mantida até o 15º DG resultou em redução do ganho de peso do 6º ao 18º DG das ratas tratadas com a dieta hipoproteica em relação as ratas tratadas com a dieta normoproteica.

Belluscio e colaboradores (2014), ao submeterem durante a gestação e lactação camundongos da linhagem CF-1 à restrição proteica, observou que as mães alimentadas com a dieta restrita em proteínas apresentaram redução do ganho de peso em períodos finais da gestação, e esta redução do ganho de peso estaria relacionada a um menor número de filhotes nascidos de mães alimentadas com a dieta hipoproteica em relação às mães alimentadas com a dieta normoproteica. Este mesmo autor demonstrou que a redução do número de filhotes de mães hipoproteicas poderia estar relacionada com um menor grau de pré-implantação em decorrência da dieta restrita em proteínas, já que esta foi dada durante a gestação.

No presente trabalho, não foram realizados testes para verificar a ocorrência de um menor número de sítios de implantação, entretanto, não descartamos a possibilidade de que este fato possa ter ocorrido, já que, foram encontradas dificuldades para obter ratas prenhes no grupo hipoproteico, e mesmo após a confirmação da prenhez no esfregaço vaginal, muitas ratas hipoproteicas não evoluíram para a gestação, sendo este fato observado somente nas ratas que receberam a dieta restrita em proteínas.

Com relação à avaliação da ingestão de ração e de água das ratas gestantes e lactantes, não foram observadas alterações significativas. Portanto, sugere-se que a perda de peso observada em mães hipoproteicas não está

relacionada a uma menor ingestão de ração durante o período gestacional já que este fato não ocorreu.

7.2 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA

No presente estudo, foi possível observar que os filhotes provenientes de mães que receberam a dieta restrita em proteínas apresentaram redução do ganho de peso a partir do 11^o DL que persistiu durante todo o período de lactação. Entretanto, a literatura demonstra que a restrição proteica está associada à restrição do crescimento intrauterino, que se refere a um padrão de crescimento fetal de baixa velocidade, segundo o qual, para sobreviver ao ambiente adverso, o organismo faz diversas adaptações metabólicas que não permite ao feto atingir o seu potencial de crescimento e apresentando baixo peso ao nascer (HOKKEN-KOELEGA, 2002).

Foi demonstrado, de acordo com Hernandez e colaboradores (2005) que ratas alimentadas com uma dieta restrita em proteínas no período gestacional deram origem a uma prole com baixo peso ao nascer, entretanto, no presente estudo observou-se uma redução significativa do ganho de peso da ninhada somente a partir do 11^o DL. As contradições nos resultados possivelmente devem-se ao fato de que nos estudos de Hernandez e colaboradores (2005) a restrição de proteínas foi administrada durante todo o período de gestação, enquanto que no presente estudo, a restrição de proteínas se deu somente durante as duas primeiras semanas de gestação.

Além disso, Gressens e colaboradores (1997) também forneceram uma dieta restrita em proteínas para ratas grávidas durante um período de 15 dias e, ao final deste período, foi observado que os filhotes provindos destas mães apresentavam menor peso corporal fetal ao final do período da restrição. Entretanto, neste mesmo estudo foi observado que quando reintroduzida a dieta normoproteica durante a última semana de gestação, houve normalização do crescimento dos filhotes. Assim, sugerimos que a restrição proteica fornecida às mães durante as duas primeiras semanas de gestação, não foi capaz de influenciar no peso dos

filhotes ao nascer devido à restauração nutricional que ocorreu na última semana da gestação. Porém a restrição proteica gestacional influencia na redução do ganho de peso da ninhada a partir do 11º DL.

Em adição, estudos demonstram que a restrição proteica durante a gestação e lactação ainda está relacionada com perda relativa da massa das glândulas mamárias, diminuição da produção diária de leite e redução de 70% dos níveis séricos de prolactina (MORETTO et al., 2011). Estes fatores poderiam contribuir para a redução do ganho de peso dos filhotes, apesar da restrição de proteínas do estudo citado ter ocorrido durante toda a gestação e lactação.

7.3 AVALIAÇÃO DO CUIDADO MATERNO DAS RATAS LACTANTES

A análise do CM na primeira semana de lactação com observações diárias, sendo três observações na fase clara (8:00, 12:00 e 16:00 horas) e um período de observação na fase do escuro (20:00 horas), permite uma descrição mais detalhada e pontual dos parâmetros maternos (CHAMPAGNE et al., 2003). Já a análise realizada no 9º DL após a separação maternal permite verificar a motivação da mãe para construir o ninho e o tempo para que isto ocorra.

Nos nossos experimentos, além dos grupos MN-FN e MH-FH foram formados outros dois grupos com o intuito de avaliar a causa das possíveis alterações nos filhotes na vida adulta. Porém, como discutido adiante, a troca de mães parece ter influenciado também nas alterações do comportamento materno.

7.3.1 Avaliação do Comportamento Materno na primeira semana de lactação

Na análise do CM por dia, as mães MN-FH, quando comparadas com mães MN-FN, apresentaram uma diminuição do CM e um aumento significativo do CñMT no 3º dia de lactação. Entretanto, no presente trabalho, esperávamos que mães que cuidaram de filhotes FH apresentassem um aumento do CM, visto que,

por serem provenientes de mães com restrição proteica estes demandariam maior cuidado materno.

Considerando-se que para a análise do CM e do CñMT foram somados todos os parâmetros maternos que a rata apresentou no dia, pode-se observar que na diminuição no CM, algum parâmetro pode ter se sobreposto aos outros e influenciado mais na diminuição do CM. Da mesma maneira, pode-se observar que no aumento do CñMT, algum parâmetro pode ter se sobreposto aos outros e influenciado mais no aumento do CñMT. Esta questão pode ser respondida com base na análise do CM na primeira semana de lactação, onde se observou que mães MN-FH, quando comparadas com mães MN-FN, apresentaram uma redução do parâmetro sobre os filhotes e um aumento do parâmetro alimentando-se.

A literatura demonstra que a dieta restrita em proteínas é capaz de alterar as interações mãe-filhote durante o período de lactação, onde mães hipoproteicas passam mais tempo no ninho cuidando de sua prole (MASSARO; LEVITSKY; BARNES, 1974). Assim, pode-se verificar que filhotes provenientes de mães hipoproteicas requerem maiores cuidados maternos. Sugerimos então, que estes cuidados maternos requerem um alto gasto de energia por parte da mãe, o que teria levado ao aumento do parâmetro alimentando-se, e como consequência esta mãe permaneceria menos tempo sobre os filhotes o que teria levado a redução do parâmetro sobre os filhotes.

Porém, um importante fato a ser notado é que no *cross-fostering* de mães MN-FH, estas mães alimentam-se mais e permanecem menos sobre os filhotes, entretanto, se o filhote FH provoca na mãe um aumento de sua alimentação e como consequência ela permanece menos tempo sobre os filhotes, este fato também deveria existir em mães MH-FH, fato este que não ocorreu no presente estudo, e até o presente momento não existe dado na literatura que possa esclarecer as alterações observadas.

7.3.2 Análise do Comportamento Materno após separação maternal

No presente estudo, mães MH-FH quando comparadas com mães MN-FN apresentaram um menor tempo para construir o ninho. De acordo com a literatura,

filhotes provenientes de mães hipoproteicas apresentam um aumento do número de vocalizações com o objetivo de chamar atenção da mãe, o que possivelmente contribuiria para a motivação da rata em construir o ninho (LEON; CROSKERRY; SMITH, 1978; HENNESSY et al., 1978). A restrição proteica do 0 DG ao 15º DG pode ter provocado um aumento no número de vocalizações destes filhotes, que funciona como estratégia de chamar a atenção da mãe. Por sua vez, as mães hipoproteicas responderiam às vocalizações construindo o ninho de forma mais rápida, como foi demonstrado no presente estudo.

Mães MH-FN, quando comparadas com mães MH-FH, apresentaram um aumento do parâmetro *other*, ou seja, um aumento do tempo em que estas ratas permaneceram sobre os filhotes sem estar em posição arqueada. Assim sugerimos que os filhotes normoproteicos requerem menores cuidados maternos, com isso a rata não apresenta comportamentos maternos exacerbados somente permanecendo sobre os filhotes o que também lhe proporciona maiores oportunidades de repouso e descanso.

Mães MN-FH, quando comparadas com mães MN-FN, apresentaram uma diminuição do tempo *off*, ou seja, redução do tempo em que essas ratas permaneciam fora do ninho alimentando-se, explorando ou não o ambiente. Com a redução do tempo *off*, conclui-se que estas ratas permaneceram mais tempo no ninho. Massaro e colaboradores (1974) observaram que ratas tratadas com dieta restrita em proteínas durante o período de lactação passaram mais tempo no ninho em comparação com o controle devido aos maiores cuidados maternos requeridos pelos filhotes provenientes de mães hipoproteicas. Apesar de no presente trabalho a restrição proteica ter ocorrido somente nas duas primeiras semanas de gestação e no estudo anterior durante toda a lactação, sugerimos que a restrição de proteínas neste período também é capaz de provocar um aumento do tempo de permanência das mães no ninho, possivelmente devido ao maior número de vocalizações produzida pelos filhotes provenientes de mães hipoproteicas, como já citado anteriormente.

Portanto, deve ser considerado que esses filhotes foram criados por mães adotivas que foram alimentadas com dieta normoproteica e assim não passaram por restrição proteica durante a gestação e supostamente estariam mais “dispostas” a atender a demanda da prole cujas mães passaram por restrição proteica gestacional.

Considerando-se que os filhotes provenientes de mães hipoproteicas vocalizam mais e como consequência estas mães permanecem mais tempo no ninho, no presente estudo, esperávamos que mães MH-FH também permanecessem mais tempo no ninho, o que não foi observado. Assim, sugerimos, que as mães que receberam a dieta restrita em proteínas durante as duas primeiras semanas de gestação estariam hiporresponsivas a algumas demandas da prole, porém não a todas já que mães MH-FH apresentaram uma maior motivação para construir o ninho. Porém até o presente momento não estão descritos na literatura os prejuízos que a restrição proteica pode causar na resposta da mãe em relação às demandas da prole. Mas possivelmente este fato pode ocorrer já que essas mães passaram por um período de restrição proteica e provavelmente possam responder menos a algumas necessidades da prole.

7.4 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Durante a lactação, as ratas exibem um comportamento preditivo de diminuição da ansiedade, chamado de ansiólise maternal, como demonstrado nos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto (LONSTEIN; SIMMONS; STERN; KEER, 1999). No presente trabalho, mães MH-FH e mães MH-FN, quando comparadas com seus respectivos controles, não apresentaram alterações do número de entradas e do tempo de permanência nos braços fechados demonstrando que a dieta hipoproteica administrada durante as duas primeiras semanas de gestação não foi capaz de alterar a ansiólise maternal.

Com relação às mães MH-FN, quando comparadas com mães MH-FH, estas apresentaram um aumento do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos. De acordo com Pellow e colaboradores (1985), animais que apresentam uma redução no comportamento preditivo de ansiedade realizam um maior número de entradas nos braços abertos e passam mais tempo nos mesmos. Assim, sugerimos que as ratas hipoproteicas que cuidaram de filhotes normoproteicos apresentam um comportamento preditivo de redução da ansiedade,

e possivelmente este comportamento possa ter se desenvolvido já que esta rata cuidou de um filhote normoproteico que demandou menores cuidados maternos.

No teste de campo aberto, mães MH-FH e mães MH-FN, quando comparadas com seu respectivo controle, não apresentaram alterações no número de cruzamentos totais, demonstrando que a dieta hipoproteica não alterou a locomoção das ratas lactantes, da mesma forma, não foram encontradas alterações significativas em nenhum dos outros parâmetros analisados no campo aberto.

7.5 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS NÃO ESTRESSADOS NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

No labirinto em T elevado, a esQUIVA inibitória está relacionada com o comportamento preditivo de ansiedade, já o escape está relacionado com o comportamento preditivo de medo e pânico (ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996). Assim, avaliando-se os parâmetros preditivos de ansiedade, medo e pânico, os ratos machos adultos do presente estudo foram submetidos ao aparato de labirinto em T elevado para avaliação destas respostas comportamentais sem a situação prévia de exposição ao estresse.

Os ratos machos adultos provenientes de mães tratadas com a dieta hipoproteica (MH-FH), apresentaram uma redução dos tempos de esQUIVA 1 e 2, ou seja, apresentaram uma redução do comportamento preditivo de ansiedade em relação ao grupo MN-FN. A literatura descreve que filhotes provenientes de mães com restrição proteica gestacional, apresentam durante a vida adulta, uma menor latência de esQUIVA 1 e 2, sem alterações na latência de escape (ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996). Da mesma forma, outro estudo demonstrou que filhotes provenientes de mães com restrição proteica no período gestacional apresentaram durante a vida adulta, uma redução do tempo de esQUIVA 1, 2 e 3 sem alterações no tempo de escape 1 e 2 (HERNANDES et al., 2005).

Assim, ao analisarem-se os grupos MN-FN/MH-FH acima citado, não se pode distinguir se a redução do comportamento preditivo de ansiedade observada nestes filhotes machos é decorrente somente do efeito da dieta na vida intrauterina ou se o CM pode ter influenciado neste comportamento na vida adulta. Então, para

compreender qual fator (CM ou dieta) estaria envolvido com as alterações comportamentais dos filhotes adultos realizou-se o *cross-fostering*, ou seja, a técnica de adoção cruzada (MOORE; POWER, 1986).

Ao analisarmos os filhotes machos MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN, observou-se que não houve alteração em nenhum dos parâmetros preditivos de ansiedade, medo e pânico analisados. Porém quando estes filhotes hipoproteicos eram cuidados por suas mães hipoproteicas, observou-se uma redução do tempo de esquiva 1 e 2 destes filhotes como descrito anteriormente. Portanto, quando esses filhotes foram cuidados por mães normoproteicas o comportamento preditivo de redução de ansiedade não ocorreu na vida adulta dos filhotes machos, demonstrando que a troca das mães possa ter influenciado nesta resposta. Porém, deve-se considerar que esse mesmo grupo teve um aumento do CM e isso pode de alguma forma ter alterado a resposta dos filhotes. Por exemplo, como esses filhotes tiveram mais cuidado materno pode ser que eles não necessitem de buscar comportamentos para superarem adversidades como as impostas pelo aparato de labirinto em T.

Nos filhotes MH-FN, quando comparados com filhotes MH-FH, observou-se um aumento do tempo de esquiva 2, sugerindo um comportamento preditivo de aumento da ansiedade. Isso pode ser devido ao fato de que suas mães MH-FN apresentaram um aumento do parâmetro em *other*, ou seja, estas mães somente permaneceram sobre os filhotes, não apresentando CM exacerbados, o que poderia ter contribuído para o comportamento preditivo de aumento da ansiedade nos filhotes MH-FN.

Com relação ao campo aberto, os filhotes MH-FH e MN-FH não apresentaram alterações significativas no número de cruzamentos totais, demonstrando que a dieta hipoproteica não alterou a locomoção dos animais provenientes de mães hipoproteicas. Filhotes MN-FH, quando comparados com seu respectivo controle, apresentaram um aumento do efeito anti-tigmotático (número de entradas no centro/número total de entradas), que pode ser referido como uma ação ansiolítica (VALLE, 1970). Inferimos que este comportamento preditivo de redução da ansiedade observado nos filhotes MN-FH pode estar relacionado à maior permanência no ninho de mães MN-FH, como observado pela redução do parâmetro tempo *off* (maior permanência das mães no ninho) do comportamento materno após separação maternal. Além do CM, outro fator que sugerimos estar envolvido com o

aumento do efeito anti-tigmotático nos filhotes MN-FH é a troca das mães, já que quando estes filhotes eram cuidados por suas mães hipoproteicas o efeito anti-tigmotático não foi observado.

7.6 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES MACHOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Como já descrito, a restrição proteica gestacional pode influenciar no comportamento preditivo de redução da ansiedade dos filhotes adultos (ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996; HERNANDES et al., 2005). Entretanto, até o presente momento, não se compreendia como seriam as respostas comportamentais dos ratos machos adultos no aparato de labirinto em T elevado em condições de pré-exposição ao estresse e ainda provindos de mães com alterações no CM.

Por isso, no presente trabalho, os filhotes dos diferentes grupos foram expostos à situação de estresse de contenção e logo após foram submetidos ao teste de labirinto em T elevado, seguido pelo teste de campo aberto.

De acordo com nossos dados, pode-se observar que os filhotes MH-FH apresentaram uma redução do tempo de esquiva 1 e 2 da mesma forma que os filhotes MH-FH que não haviam sido expostos ao estresse de contenção. Assim, sugerimos que o estresse durante a vida adulta não foi capaz de alterar o comportamento preditivo de redução da ansiedade dos filhotes provenientes de mães hipoproteicas.

Considerando que durante a lactação, os filhotes MH-FH receberam maiores cuidados maternos após separação maternal com redução do tempo para construir o ninho, deduz-se que este parâmetro maternal possa ter influenciado na redução do comportamento preditivo de ansiedade na prole MH-FH. A literatura descreve que a prole de mães com alto índice de cuidado materno, quando adultos, apresentam respostas de menor temor frente a novos acontecimentos e baixa ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) quando comparado com os filhotes de mães pouco cuidadoras (CHAMPAGNE; MEANEY, 2001; PRYCE et al., 2001).

Na análise de filhotes MN-FN/MN-FH, estes apresentaram uma redução do tempo de esquiva 1 e escape 1. Quando estes filhotes hipoproteicos eram cuidados por suas mães biológicas hipoproteicas apresentavam também uma redução do tempo de esquiva 1 e 2. Assim pode-se observar quando os filhotes MN-FH eram cuidados por suas mães biológicas MH-FH, estes apresentavam um comportamento preditivo de redução da ansiedade, e mesmo após a troca das mães (MN-FH) este comportamento persistiu.

Assim sugerimos que a redução do comportamento preditivo de redução da ansiedade nos filhotes MN-FH possa estar relacionado com a redução do tempo *off* de mães MN-FH durante a lactação. Ou seja, estes filhotes contaram com uma maior presença da mãe na área do ninho o que possivelmente contribuiria para o comportamento preditivo de redução da ansiedade. Com relação a redução do tempo de escape 1 (preditivo de medo e pânico), sugerimos que a troca das mães possa ter influenciado neste comportamento, já que quando os filhotes MN-FH eram cuidados por suas mães biológicas, este comportamento não foi observado, além disso o estresse também poderia ter influenciado neste comportamento já que em situações de não estresse, este comportamento não existiu.

Quando adultos, os filhotes MH-FH/MH-FN apresentaram um aumento no tempo de esquiva 1 e 2 e uma redução no tempo de escape 1 em situações de exposição ao estresse. Ou seja, durante a vida adulta, estes filhotes apresentaram um comportamento preditivo de aumento da ansiedade e um comportamento preditivo de medo e pânico. Sugerimos que a redução do tempo de escape 1, que é um comportamento preditivo de medo e pânico, possa estar relacionado ao fator estresse, já que em condições de não estresse, este comportamento não existiu.

Além disso, mães MH-FN comparadas com MH-FH tiveram aumento do parâmetro tempo em *other*. Apesar de este parâmetro ser considerado um parâmetro materno (NUMAN, 1994) deve-se considerar que ao haver um aumento deste, possivelmente outros comportamentos maternos mais expressivos como cifo e lambida podem estar reduzidos ou sendo executados menos. Desta maneira, não deve ser descartado que a alteração no CM pode também ter influenciado na alteração do comportamento dos filhotes no aparato labirinto em T elevado após a exposição ao estresse.

Com relação ao campo aberto, os filhotes MH-FH e MN-FH não apresentaram alterações significativas no número de cruzamentos totais,

demonstrando que a exposição ao estresse não alterou a locomoção dos animais provenientes de mães hipoproteicas. Além disso, não houve alteração entre os grupos experimentais em nenhum outro parâmetro analisado após exposição ao estresse no aparato do campo aberto.

7.7 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS AUTONÔMICAS AO ESTRESSE

Durante o estresse de contenção, ocorrem mudanças autonômicas e endócrinas que incluem aumento da PAM, aumento da FC, aumento da temperatura corporal e ativação do eixo HHA (BUSNARDO et al., 2010; REIS et al., 2011; VIANNA; CARRIVE, 2005).

O córtex pré-frontal medial é uma estrutura límbica envolvida no controle do comportamento e das respostas autonômicas ao estresse. O córtex pré-límbico é uma subdivisão do córtex pré-frontal medial e possui conexões com estruturas relacionadas ao controle cardiovascular (TERREBERRY; NEAFSEY, 1987; VERTES, 2004). As variações no cuidado materno parecem influenciar no desenvolvimento de circuitos neurais que regulam respostas endócrinas e comportamentais ao estresse dessas regiões acima citadas (MEANEY, 2001).

No presente estudo, os filhotes machos adultos MN-FN, MH-FH, MN-FH e MH-FN foram submetidos à avaliação das respostas autonômicas ao estresse durante a vida adulta. Entretanto, somente filhotes MN-FH quando comparados com filhotes MN-FN apresentaram redução significativa da PAM. Entretanto, quando estes filhotes hipoproteicos eram cuidados por suas mães biológicas MH-FH, o parâmetro de PAM não foi alterado, sendo observada alteração deste parâmetro somente após a troca das mães. Assim inferimos que a troca das mães tenha influenciado na redução da PAM destes filhotes.

Além disso, deve ser lembrado que mães MN-FH comparadas com MN-FN tiveram uma diminuição do CM um aumento do CñMT no 3º DL, além de uma redução do parâmetro sobre os *pups*, aumento do parâmetro alimentando-se e redução do parâmetro tempo em *off*. Essas alterações maternas (aumento do CM e busca por mais comida para possivelmente nutrir a prole) podem ser responsáveis

por uma hiporresponsividade à resposta ao estresse desses filhotes FH que foram cuidados por mães MN.

Adicionalmente, a redução da PAM desse grupo de filhotes (MN-FH) está de acordo com nossos resultados no campo aberto, onde filhotes mesmo não estressados apresentaram aumento do efeito anti-tigmotático. Portanto, sugerimos que a troca das mães e as alterações dos cuidados maternos citadas acima possam estar envolvidas com a redução da PAM no grupo MN-FH quando comparado ao grupo MN-FN. Entretanto, não existem dados na literatura que tenham uma explicação plausível para o fato da troca das mães ter influenciado nas respostas autonômicas dos filhotes, sendo necessárias maiores investigações que possam elucidar este fato. Ao contrário, existem vários estudos demonstrando que aumento de parâmetros maternos podem ocasionar uma hiporresponsividade ao medo quando os filhotes adultos são expostos em situações de estresse (MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004).

8 CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados pode-se concluir que filhotes de mães hipoproteicas cuidados por suas mães hipoproteicas apresentam um comportamento preditivo de redução da ansiedade durante a vida adulta mesmo após a situação de estresse. Isso pode ser devido essas mães serem mais motivadas a construir o ninho, além disso, esses filhotes devido à restrição proteica intrauterina, demonstram hiporresponsividade quando expostos a situações adversas na vida adulta.

Além disso, após o *cross-fostering* houve alterações no comportamento e também nos filhotes machos quando adultos, alterando as respostas comportamentais e autonômicas de filhotes de mães hipoproteicas cuidados por mães normoproteicas. Assim, no presente trabalho, o emprego da técnica de *cross-fostering* não nos permitiu verificar se as alterações comportamentais nos filhotes adultos foi proveniente da dieta ou do CM alterado, ao contrário, com o emprego desta técnica, comportamentos que não existiam passaram a existir após a troca das mães e comportamentos que existiam, após a troca, desapareceram, dificultando assim as análises posteriores.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition affects avoidance but not escape behavior in the elevated T-maze. **Physiol Behav**, v. 60, n. 1, p. 191-195, jul.1996.

BARKER, D. J. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**, v. 341, n. 8850, p. 938-941, apr. 1993.

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

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

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

BOSCH, O. J. et al. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 3, p. 267-278, apr. 2007.

BUSNARDO, R. F. et al. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Auton Neurosci**, v. 158, n. 1-2, p. 51-57, apr. 2010.

BUYNITSK, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 7, p. 1089-1098, jul. 2009.

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

CALIXTO, A. V. et al. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 1, p. 37-42, may 2001.

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

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

CIRULLI, F.; BERRY, A.; ALLEVA, E. Early disruption of the mother-infant relationship: Effects on brain plasticity and implication for psychopathology. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 1-2, p. 73-82, jan./mar. 2003.

CONNOR, K. L. et al. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. **J Physiol**, v. 590, pt. 9, p. 2167-2180, may 2012.

COSTA, H. H.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: consequences for fear conditioning in adulthood males. **Behav Brain Res**, v. 257, p. 31-38, nov. 2013.

DEBASSIO, W. et al. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in hippocampal formation. **Brain Res Bull**, v. 35, n. 1, p. 57-61, 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. 2013. Disponibiliza dados sobre a agricultura mundial. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

FERREIRA, A. et al. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiol Behav**, v. 77, n. 2-3, p. 197-204, nov. 2002.

FLEMING, A. S.; ROSEMBLATT, J. S. Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. **J Comp Physiol Psychol**, v. 86, n. 2, p. 221-232, feb. 1974.

FLEMING, A. S.; WALSH, C. Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 5-7, p. 429-443, 1994.

FRANCIS, D. D. et al. Nongenomic transmission across generations in maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1155-1158, nov. 1999.

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

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

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

HENNESSY, M. B. et al. Stimuli from pups of adrenalectomized and malnourished female rats. **Physiol Behav**, v. 20, n. 5, p. 509-514, may 1978.

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

HOKKEN-KOELEGA, A. C. R. Timing of puberty and fetal growth. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 16, n. 1, p. 65-71, mar. 2002.

HUNTINGFORD, F. A. "Animals fight but do not make a war". In: GROEBEL, J.; HINDE, R. A. (editores). **Agression and war – their biological and social bases**. Cambridge: Cambridge University Press, apr. 1989. p. 25-34.

KAFFMAN, A.; MEANEY, M. J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 48, n. 3-4, p. 224-244, mar./apr. 2007.

LEON, M.; CROSKERRY, P. G.; SMITH, G. K. Thermal control of mother-young contact in rats. **Physiol Behav**, v. 21, n. 5, p. 793-811, nov. 1978.

LISTER, J. P. et al. Asymmetry of neuron numbers in the hippocampal formation of prenatally malnourished and normally nourished rats: a stereological investigation. **Hippocampus**, v. 16, n. 11, p. 946-958, nov. 2006.

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

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, discussion 50-5, p. 38-50, 1991.

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

MACCARI, S. et al. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 10, p. 707-723, oct. 2014.

MANN, P. E. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiol Behav**, v.88, n. 4-5, p. 333-338, jul. 2006.

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

MATTSON, B. J. et al. Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 3, p. 683-694, jun. 2001.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Ann Rev Neurosci**, v. 24, p. 1161-1192, 2001.

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

MOLINOFF, P. B.; WEINSHILBOUM, R.; AXELROD, J. A sensitive enzymatic assay for dopamine- β -hydroxylase. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 178, n. 3, p. 425-431, sep. 1971.

MOORE, C. L.; POWER, K. L. Prenatal stress affects mother-infant interaction in Norway rats. **Dev Psychobiol**, v. 19, n. 3, p. 235-245, may 1986.

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

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

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

MORGANE, P. J.; GALLER, J. R.; MOKLER, D. J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Prog Neurobiol**, v. 75, n. 2, p. 143-160, feb. 2005.

NEUMANN, I. D. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. **J Neuroendocrinol**, v. 20, n. 6, p. 858-865, jun. 2008.

NUMAN, M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. **Acta Paediatr Suppl**, v. 397, p. 19-28, jun. 1994.

NUMAN, M.; INSEL R. T. **The Neurobiology of Parental Behavior**. v. 1. New York: Springer, 2003. 418p.

NUMAN, M.; NAGLE, D. S. Preoptic area and substantia *nigra* interact in the control of maternal behavior in the rat. **Behav Neurosci**, v. 97, n. 1, p. 120-139, feb. 1983.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural system in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Front Neuroendocrinol**, v. 30, n. 1, p. 46-64, jan. 2009.

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403p.

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

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

RASMUSSEN, K. M.; YAKTINE, A. L. (editors). **Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2009.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, nov. 1993.

REIS, D. G. et al. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. 1-7, aug. 2011.

ROTS, N. Y. et al. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. **J Neuroendocrinol**, v. 8, n. 7, p. 501-506, jul. 1996.

ROTTA, L. N. et al. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. **Neurochem Res**, v. 28, n. 8, p. 1181-1186, aug. 2003.

SHEEHAN, T. et al. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial nuclei to inhibit maternal behavior in rats. **Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 341-356, 2001.

SHILS, M. E. et al. (editors). **Modern nutrition in health and disease**. 10. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

STEIGER, J. L. et al. Effects of prenatal malnutrition on GABAA receptor alpha1, alpha3 and beta2 mRNA levels. **Neuroreport**, v. 14, n. 13, p. 1731-1750, sep. 2003.

STERN, J. M.; KEER, S. E. Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. **Behav Brain Res**, v. 99, n. 2, p. 231-239, mar. 1999.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 4, p. 571-576, apr. 2000.

TERREBERRY, R. R.; NEAFSEY, E. J. The rat medial frontal cortex projects directly to autonomic regions of the brainstem. **Brain Res Bull**, v. 19, n. 6, p. 639-649, dec. 1987.

URIARTE, N. et al. Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. **Dev Psychobiol**, v. 49, n. 5, p. 451-462, jul. 2007.

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

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, jan. 2004.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 3, p. 549-554, nov. 1994.

VIANNA, D. M.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 9, p. 2505-2512, may 2005.

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

ZANGROSSI, H. J. R.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46, pt. 3, oct. 2014.

WIGGINS, R. C.; FULLER, G.; ENNA, S. J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. **Life Sci**, v. 35, n. 21, p. 2085-2094, nov. 1984.

WOODS, L. L. et al. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. **Pediatr Res**, v. 49, n. 4, p. 460-467, apr. 2001.