



unesp 
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências de Botucatu

MEMÓRIA E HIPOCAMPO:
Implicações da Redução da Dieta em ratos adultos cujas mães
sofreram Restrição Alimentar durante a prenhez e lactação

Gabriela Larissa Lima da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Prof. Assoc. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Botucatu – SP

2022



unesp 
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências de Botucatu

MEMÓRIA E HIPOCAMPO:
Implicações da Redução da Dieta em ratos adultos cujas mães
sofreram Restrição Alimentar durante a prenhez e lactação

Gabriela Larissa Lima da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Prof. Assoc. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Botucatu – SP

2022

S586m

Silva, Gabriela Larissa Lima da

Memória e Hipocampo : Implicações da Redução da Dieta em ratos adultos cujas mães sofreram Restrição Alimentar durante a prenhez e lactação / Gabriela Larissa Lima da Silva. -- , 2022

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu,

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

1. Neurociências. 2. Memória. 3. DOHaD. 4. Programação Fetal. 5. Alimentação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriela Larissa Lima da Silva

**MEMÓRIA E HIPOCAMPO:
Implicações da Redução da Dieta em ratos adultos cujas mães
sofreram Restrição Alimentar durante a prenhez e lactação**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Comissão examinadora:

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Depto. de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências /Botucatu - Unesp

Prof. Dr. Ricardo Cardoso Cassilhas
Departamento de Educação Física / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Departamento de Ciências Fisiológicas / Universidade do Estado do Rio De Janeiro - UERJ

Botucatu, 21 de julho de 2022.

Dedico este trabalho à Davi Barcellos Muller, chefe da seção técnica de pós graduação durante a realização deste mestrado, uma pessoa cuja competência e paciência admirei desde a primeira vez em que o vi.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à Arthur Gasparindo Moreira por todo o apoio prestado durante a realização deste trabalho. Este apoio começou como um incentivo e em pouco tempo se transformou numa contribuição ativa. Sem a sua ajuda, este trabalho jamais seria possível, obrigada por ser uma inspiração e uma força para mim.

Também gostaria de agradecer ao meu orientador, José de Anchieta de Castro e Horta Junior, por ter me dado ouvidos e meios de realizar esse projeto da melhor forma possível, sem nunca desincentivar a minha curiosidade. O conhecimento técnico-científico advindo dessa relação, embora muito vasto, não representa nem metade dos aprendizados que pude depreender dessa pessoa tão ímpar, ética e comprometida.

Agradeço também à toda a minha família por sempre ter acreditado em mim e me incentivado, ainda que à distância. Lindalva, Bruna, Beatriz e Ana, vocês foram essenciais para minha jornada muito antes de eu saber para onde estava caminhando.

Aos meus colegas de laboratório, Youssef, Isabela, Mariana, Beatriz, Carla e Marina por serem sempre muito solícitos e tornarem até os meus mais árduos dias de trabalho divertidos e leves, e claro, por terem contribuído com esta pesquisa da forma que foi cabível.

Agradeço também aos meus companheiros da República Caverna do Dragão pela fabulosa experiência de vida proporcionada, e, particularmente ao Vinicius de Oliveira, um dos mais famosos apoiadores de “Derra” (vulgo eu).

Meu mais sincero agradecimento à minha banca de qualificação, composta por Cláudio Aparecido Casatti, Norberto Garcia Cairasco e Patricia Aline Boer, cujas perspectivas enriqueceram sobremaneira esta dissertação e me incentivaram a ir mais longe nesta trajetória. As contribuições prestadas foram verdadeiramente valiosas para a minha construção enquanto cientista.

Agradeço também à minha Banca de Defesa, composta por Ricardo Cardoso Cassilhas, Egberto Gaspar de Moura e José de Anchieta de Castro e Horta Junior, que fizeram contribuições extremamente relevantes e tornaram salutar o momento de obtenção deste título. Muito obrigada por todo o incentivo e pela valorosa arguição proporcionada.

À Ana Carolina Inhaz Kiss por toda a prestimosidade desde o início, pela zelosa consultoria e finalmente pela consolidação de uma parceria, e à Gustavo Venancio da Silva pela cooperação nesta associação.

Agradeço também à Fabio Anselmo pela disponibilidade e boa vontade para compartilhar sua experiência como pesquisador.

À Ariana Musa de Aquino, pela genuína preocupação comigo no momento em

que tudo ainda era muito incerto. Você é uma pessoa incrível, Ariana, muito obrigada!

Agradeço ainda ao Sr. Eduardo Castilho pelo auxílio e esmero na construção do labirinto de Barnes.

Por fim, agradeço enormemente a cada um dos amigos que já passaram em minha vida. Guardei um pedacinho de cada um de vocês em mim. Obrigada por me construírem e reconstruírem.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) na forma de bolsa (código 88887.502819/2020-00) e com insumos adquiridos através de auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (16/13136-6).

“Saber como pensar torna a pessoa muito mais capaz do que aquele que apenas sabe o que deve pensar.”

(Neil deGrasse Tyson).

RESUMO

A memória é um componente cognitivo extremamente relevante e sua formação e consolidação dependem do hipocampo, estrutura muito sensível a fatores ambientais, incluindo a dieta. Atualmente cerca de 820 milhões de pessoas vivem em situação de fome, abrangendo gestantes e lactantes. A fome no período de prenhez e lactação é um importante indutor de programação fetal, conforme a teoria das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD). De acordo com a literatura, a restrição alimentar nas fases de desenvolvimento pode resultar em prejuízo do desempenho cognitivo e redução da plasticidade do hipocampo, ao passo que a redução alimentar na fase adulta pode ter o efeito oposto, a depender da intensidade e duração. Embora muitos estudos tenham sido feitos nesses dois sentidos, ainda é desconhecido o efeito da restrição da dieta em ambos os períodos, além de ser desconhecido o papel da programação por restrição na preferência alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a memória e o hipocampo de ratos Wistar submetidos à redução alimentar na fase adulta associada à programação por restrição da dieta no período de prenhez e lactação, além de determinar o efeito da programação na preferência alimentar de ratos na infância. Para sua execução, ratos Wistar prenhas foram separadas em dois grupos: programação controle (PC), dieta normal ad libitum; e programação por restrição calórica (PR), dieta de 50% de restrição em relação ao grupo controle durante os períodos de prenhez e lactação. Aos 30 dias cada ninhada realizou um teste de preferência alimentar ou teste de preferência à sacarose. Estes grupos foram posteriormente subdivididos com relação à restrição alimentar na fase adulta: o grupo alimentação controle, dieta ad libitum (AC) ao longo de toda vida e o grupo alimentação restrita (AR), que recebeu dieta com redução de 30% em relação ao controle dos 60 aos 100 dias de idade, totalizando 4 grupos: PC-AC, PC-AR, PR-AC e PR-AR. Foram realizados os testes comportamentais de Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Reconhecimento de Novo Objeto (NORT), Localização de Objeto (OLT) e Labirinto de Barnes. Após estes testes, os animais foram perfundidos e os encéfalos coletados. No dia da eutanásia, foi mensurada a glicemia, peso corporal, peso do encéfalo, distância naso-anal, gordura (visceral, periepídídima e retroperitoneal) e foram coletados os pêlos dos animais para análise da razão isotópica de nitrogênio e carbono. Os encéfalos foram submetidos ao protocolo de imunohistoquímica para GFAP, doublecortina, FOS e NeuN. Em relação à preferência alimentar, os animais programados apresentaram maior coeficiente de preferência à dieta hiperglicídica em relação ao Grupo Controle. Nos resultados de LCE, NORT e OLT não foi possível observar efeitos relevantes, enquanto em CA observou-se diferenças no perfil exploratório dos animais, sendo que os animais programados apresentaram menor tempo de imobilidade e mais levantares. No labirinto de Barnes foi observado que houve aprendizado em todos os grupos, sendo que o grupo PR-AC teve um maior número de erros no teste de retenção de memória. Os dados biométricos mostraram que os animais programados apresentaram encéfalos menores, embora não tenham alterações no índice de encefalização. Os valores de peso, distância naso-anal e gorduras refletiram a aplicação das dietas, onde o grupo PR-AR apresentou os menores valores em todas as análises. Ademais, foi encontrada diferença nas razões isotópicas de carbono e nitrogênio, denotando mudanças na constituição corporal entre os grupos. Houve ainda alteração significativa na expressão da proteína FOS no giro denteado inferior dos animais, sendo que os grupos com restrição alimentar em qualquer fase apresentaram mais células marcadas que o grupo controle. Em relação à neurogênese, o grupo PR-AR apresentou menos células marcadas do que o grupo PC-AC, no entanto, não foram encontradas diferenças em relação ao GFAP e NeuN. Concluímos que a restrição alimentar realizada em duas fases da vida gerou alterações biométricas, reduziu a neurogênese, aumentou a expressão de FOS, embora não tenha gerado alterações na memória de reconhecimento, na ansiedade e na citoarquitetura hipocampal.

Palavras-chave: DOHaD, restrição calórica, cognição, aprendizado, comportamento alimentar, programação fetal.

ABSTRACT

Memory is an extremely relevant cognitive component and its formation and consolidation depend on the hippocampus, a structure that is very sensitive to environmental factors, including diet. Currently, around 820 million people live in a situation of hunger, including pregnant and lactating women. Hunger during pregnancy and lactation is an important inducer of fetal programming, according to the theory of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). According to the literature, food restriction in the developmental stages can result in impairment of cognitive performance and reduced plasticity of the hippocampus, whereas food restriction in adulthood can have the opposite effect, depending on the intensity and duration. Although many studies have been carried out in these two directions, the effect of diet restriction in both periods for the same individual is still unknown, in addition to the role of restriction programming in food preference. The objective of this work was to evaluate the memory and hippocampus of Wistar rats submitted to food reduction in adulthood associated with programming by diet restriction during pregnancy and lactation, while also determining the effect of programming on the food preference of rats in childhood. For this purpose, pregnant Wistar rats were divided into two groups: control programming (PC), normal diet ad libitum; and food restriction programming (PR), 50% restriction diet compared to the control group during pregnancy and lactation periods. At 30 days each litter was subjected to a food preference test or sucrose preference test. Each group was then subdivided into two more groups, based on the food restriction in adulthood: the control food group, ad libitum diet (AC) throughout life and the restricted food group (AR), which received a diet with a 30% reduction in relation to the control from 60 to 100 days old, adding up to 4 groups: PC-AC, PC-AR, PR-AC and PR-AR. They were subjected to Open Field (OF), Elevated Plus Maze (EPM), New Object Recognition (NORT), Object Location (OLT) and Barnes Maze behavioural tests. After which, the animals were subjected to transcardiac perfusion and the brains collected. On the day of euthanasia, blood glucose, body weight, brain weight, naso-anal distance, fat weight (visceral, periepididymal and retroperitoneal) were measured and the animals' hair was sampled for the nitrogen and carbon isotopic ratio analysis. The brains were submitted to the GFAP, doublecortin, FOS and NeuN immunohistochemistry protocols. Regarding food preference, the programmed animals showed a higher coefficient of preference for the high-glycemic diet in relation to the Control Group. In the results of EPM, NORT and OLT it was not possible to observe relevant effects, while differences were observed in the exploratory profile of the animals during OF, the programmed animals presented less time of immobility and more rises. In the Barnes maze, it was observed that there was learning in all groups, and the PR-AC group had a greater number of errors during the memory retention test. The biometric data showed that the programmed animals had smaller brains, although they did not have alterations in the encephalization index. Weight, naso-anal distance and fat values reflected the application of diets, where the PR-AR group had the lowest values in all analysis. Furthermore, differences were found in the isotopic ratios of carbon and nitrogen, denoting changes in body constitution between the groups. There was also a significant change in the expression of the FOS protein in the inferior dentate gyrus of the animals, and the groups with food restriction at any stage had more marked cells than the control group. Regarding neurogenesis, the PR-AR group had fewer marked cells than the PC-AC group, however, no differences were found in relation to GFAP and NeuN. We conclude that food restriction performed in two stages of life generated biometric changes, reduced neurogenesis, increased FOS expression, although it did not generate changes in recognition memory, anxiety and hippocampal cytoarchitecture.

Keywords: DOHaD, calorie restriction, cognition, learning, eating behavior, fetal programming.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 MEMÓRIA E HIPOCAMPO	20
2.1.1 GERAL	20
2.1.2 ESPECÍFICOS	20
2.2 PREFERÊNCIA ALIMENTAR E PREFERÊNCIA À SACAROSE	20
3 METODOLOGIA	20
3.1 ANIMAIS	20
3.2 COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	23
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	25
3.3.1 <i>Campo Aberto</i>	26
3.3.2 <i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	27
3.3.3 <i>Labirinto de Barnes</i>	28
3.3.4 <i>Teste de Reconhecimento de Novo Objeto (NORT)</i>	30
3.3.5 <i>Teste de Localização de Objeto (OLT)</i>	31
3.3.5.1 <i>Execução dos testes de Reconhecimento e Localização de Objeto</i>	31
3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS	33
3.4.1 <i>Preparo de material biológico</i>	33
3.4.2 <i>Estudo da imunorreatividade ao neuN, Doublecortina, FOS e GFAP</i>	35
3.4.3 <i>Forma de análise dos resultados morfométricos</i>	36
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4. RESULTADOS	39
4.1 PROGRAMAÇÃO	39
4.2 PREFERÊNCIA ALIMENTAR E PREFERÊNCIA À SACAROSE	39
4.3 DADOS BIOMÉTRICOS.....	43
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	49
4.4.1 <i>Campo Aberto</i>	49
4.4.2 <i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	51
4.4.3 <i>Reconhecimento de Novo Objeto e Localização de Objeto</i>	52
4.4.4 <i>Labirinto de Barnes</i>	54

4.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS	60
4.5.1 <i>Tamanho do Hipocampo</i>	60
4. 5.2 <i>Proteína FOS</i>	60
4.5.3 <i>Doublecortina</i>	62
4.5.4 <i>NeuN</i>	64
4.5.5 <i>GFAP</i>	67
5. DISCUSSÃO	68
5.1 <i>PREFERÊNCIA ALIMENTAR</i>	68
5.2 <i>DADOS BIOMÉTRICOS</i>	69
5.3 <i>COMPORTAMENTO</i>	71
5.4 <i>MORFOLOGIA</i>	74
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXO 1 – INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DA RAÇÃO.....	85

1 INTRODUÇÃO

Atualmente cerca de 702 a 828 milhões de pessoas foram afetadas pela fome, número que cresceu em 150 milhões com o início da pandemia de Covid-19, refletindo a exacerbada desigualdade social em muitos países (FAO *et al.*, 2021). A pandemia da covid-19 deflagrou também um aumento da insegurança alimentar, que se trata da falta de acesso físico, financeiro ou social à alimentos que satisfaçam as necessidades nutricionais do indivíduo. No ano de 2021 haviam 2,3 bilhões de pessoas no mundo com insegurança alimentar moderada ou grave (equivalente a 29,3% da população mundial). Ademais, estima-se que 22% das crianças com menos de cinco anos de idade estavam atrofiadas e 6,7% desnutridas, sendo que as crianças em ambientes rurais e famílias mais pobres, cujas mães não receberam educação formal, eram mais vulneráveis ao atraso no crescimento e à magreza extrema (FAO *et al.*, 2019). Todo esse cenário contraria totalmente vários dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável propostos pela ONU relacionados com o combate à fome e à desigualdade social, mostrando o quão pertinente é a criação de ações no sentido de cumprir com estes objetivos.

A última estimativa para baixo peso ao nascer, em 2015, revelou que 14,6% dos recém-nascidos (20,5 milhões) nasceram com baixo peso, condição que pode resultar em prejuízos para a saúde, a cognição e o desenvolvimento. Esse dado reflete o fato de que a insegurança alimentar também afeta gestantes e lactantes em ampla escala (FAO *et al.*, 2019), o que caracteriza um problema extremamente sério, pois durante o período de gestação e lactação, todas as necessidades nutricionais do embrião, feto e do neonato dependem da mãe. Deste modo, as alterações no estado nutricional materno durante estágios importantes de desenvolvimento, podem gerar modificações estruturais e fisiológicas significativas na prole, caracterizando uma programação do organismo (MCARDLE *et al.*, 2006).

O termo “Programação” se refere a adaptações do organismo frente a adversidades ocorridas em fases importantes de seu desenvolvimento (no período embrionário, fetal, neonatal, infância e adolescência). Tais adaptações podem gerar efeitos perduráveis na estrutura e função de órgãos (OZANNE, 2001). A observação de que o início da vida tem um papel relevante para a saúde a longo prazo já havia sido relatada anteriormente (BARKER e OSMOND, 1986). Este foi o ponto de partida para o surgimento da teoria das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD), (BARKER, 2004; 2007; WADHWA *et al.*, 2009), que postula justamente que os fatores ambientais no início da vida se refletem na vulnerabilidade a desenvolver doenças mais tarde no adulto. A desnutrição embrionária e fetal, por exemplo, está associada com o desenvolvimento posterior de diabetes, doenças cardiovasculares e metabólicas (BARKER, 2004), conforme observado nas circunstâncias da

fome holandesa (ROSEBOOM *et al.*, 2001; ROSEBOOM, 2019), onde ao observar epidemiologicamente um grande grupo de pessoas, foi possível reconhecer que muitos dos indivíduos que apresentavam doenças cardiovasculares haviam nascido com baixo peso.

O mecanismo DOHaD mais bem descrito, ocorre porque a má nutrição materna repercute na mal formação de anexos embrionários de modo que a restrição alimentar atua como um facilitador da permeabilidade de glicorticoides na placenta ao diminuir a expressão da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase placentária 2 (HSD), responsável por converter o cortisol materno ativo em cortisona inativa, gerando uma diferença de concentração do hormônio entre a mãe e o feto. Além de aumentar a passagem dos glicocorticoides, a própria restrição alimentar é um agente estressor que pode elevar os níveis do cortisol materno. O cortisol possui um papel fundamental na sinalização da maturação tecidual, interrompendo os processos proliferativos, sendo portanto, esperado que o cortisol materno chegue biologicamente ativo ao feto nos estágios finais da gestação para que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal da prole torne-se funcional e passe a produzir este hormônio, completando a diferenciação celular de diversos sistemas. Assim, caso ocorra a exposição precoce a este hormônio, os sistemas poderão ser diferenciados antes de completar seu desenvolvimento proliferativo, gerando diversas repercussões negativas ao longo da vida da prole (KAPOOR *et al.*, 2006; MOISIADIS e MATTHEWS, 2014; VAN GRONIGEN CASE *et al.*, 2021).

A despeito da possibilidade de aumentar a vulnerabilidade à doenças, a programação possui um imenso valor adaptativo na medida em que ela é uma forma de preparar o feto para o ambiente que o aguarda após o nascimento. Fenótipos de tamanho pequeno e metabolismo lento podem favorecer a sobrevivência em ambientes com pouca disponibilidade de alimento, por exemplo, enquanto fenótipos maiores, com metabolismo rápido, apresentam vantagens para o sucesso reprodutivo. Essa adaptação torna-se um problema principalmente quando ocorre uma mudança do ambiente em que o indivíduo foi programado (BATESON *et al.*, 2004). No caso da programação por restrição alimentar, ao se deparar com um contexto de abundância, a prole pode apresentar o fenômeno conhecido como “Catch-up”, que se trata de um período de crescimento acelerado em relação à taxa normal, e este fenômeno está implicado em distúrbios sistêmicos endócrinos, respiratórios, metabólicos (ACKLAND e PREECE, 1987; FINKIELSTAIN *et al.*, 2013). Para pequenos roedores a mudança dietética na lactação é especialmente relevante, pois essas espécies, com exceção da cobaia, são consideradas altriciais, portanto, são imaturos ao nascimento quando comparados a humanos, e seu desenvolvimento segue muito intenso nos primeiros dias de vida (MCMULLEN e MOSTYN, 2009).

Em relação ao papel da dieta materna nos hábitos de vida da prole, existem evidências mostrando que a restrição proteica durante a prenhez ou lactação, pode, por exemplo, interferir no apetite e preferências alimentares da prole (BELLINGER *et al.*, 2004; BELLINGER e LANGLEY-EVANS, 2005). A preferência por um determinado tipo de alimento depende de diversos fatores neurobiológicos, como a percepção do sabor e a composição nutricional (SCLAFANI, 2001), que corresponderão ao circuito de alimentação estabelecido no indivíduo, envolvendo a dimensão orossensorial, visceral e de recompensa (ZELTSER, 2018). Apesar de ser conhecido o fato de que o estado nutricional materno pode interferir nesta questão (ONG e MUHLHAUSLER, 2011), a restrição alimentar propriamente dita nunca foi investigada neste cenário, embora saiba-se que ela é capaz de gerar consequências em longo prazo na biometria e no metabolismo energético da prole (MCMILLEN *et al.*, 2005; MCARDLE *et al.*, 2006; PICO *et al.*, 2012), além de alterar a razão isotópica de nitrogênio e carbono em diferentes tecidos (PETZKE *et al.*, 2010; HUNEAU *et al.*, 2019). Assim, a subnutrição materna e infantil é responsável por diversas condições patológicas que podem ocorrer ao longo da vida (BLACK *et al.*, 2008; VOHR *et al.*, 2017), tendo um impacto negativo inclusive no desenvolvimento cognitivo, desempenho escolar e produtividade. Essa circunstância, quando não é devidamente reparada com a estimulação cognitiva adequada, se torna um importante fator de risco que contribui para que 200 milhões de crianças deixem de atingir seu potencial pleno de desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014), sendo que dentre os impactos cognitivos podemos destacar os prejuízos de memória e aprendizagem (GALLER e RAMSEY, 1989; TONKISS e GALLER, 1990; FUKUDA *et al.*, 2002).

A memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, processar, armazenar e recuperar informações, e é indispensável para a aprendizagem, adaptação e sobrevivência de todo organismo vivo (FIETTA, 2011). Cada uma das etapas envolvidas no processo de memorização, como a codificação, armazenamento, persistência e evocação das informações adquiridas, pode ser caracterizada por alterações no nível celular, molecular e/ou comportamental (BONINI *et al.*, 2007).

Hoje existem diversas formas de classificar memórias, e uma delas é com relação à duração, que pode ser de curto prazo (memórias que duram horas ou poucos dias) ou longo prazo (memórias que duram anos, ou mesmo a vida inteira). As memórias de longo prazo, por sua vez, podem ser divididas entre memórias explícitas, também conhecidas como declarativas, e memórias implícitas. As memórias explícitas são aquelas que estão acessíveis ao nível da consciência e podem ser verbalizadas, e elas abrangem fatos e eventos, podendo ser referenciada como memória episódica, para eventos biográficos, e memória semântica, para

fatos aprendidos. A memória implícita, por outro lado, não pode ser verbalizada, e compreende, por exemplo, a memorização de programas motores, a que chamamos de memória procedural. Existe ainda a memória operacional, ou memória de trabalho, cuja duração é de apenas alguns segundos, ou no máximo minutos, pois ela desaparece assim que o indivíduo deixa de despende atenção em sua manutenção, de modo que ela é utilizada durante a execução de tarefas específicas. E há ainda a memória espacial, que é responsável pela recordação de percursos, posições de objetos e locais, e pode se manifestar de forma implícita ou explícita (SQUIRE, 2009; SQUIRE e WIXTED, 2011; SQUIRE e DEDE, 2015).

A memória, especialmente a operacional, é um dos componentes fundamentais da função executiva. A função executiva trata-se da capacidade de selecionar informações, avaliar situações, tomar decisões e gerar uma resposta voluntária adequada a cada contexto a que as pessoas são expostas, ou seja, relaciona-se com comportamentos auto-organizados orientados à objetivos específicos. Esta função executiva conta com um circuito cognitivo complexo que envolve diversas áreas cerebrais, de modo que eventuais comprometimentos de qualquer um dos seus constituintes, incluindo a memória e a aprendizagem, podem refletir na qualidade de vida individual (DIAMOND, 2013; FRIEDMAN e MIYAKE, 2017).

A capacidade de memorização passou a ser amplamente estudada no século XX, a partir de casos clínicos de perda total ou parcial deste componente. O episódio mais famoso para estudo de correlação entre estrutura e função foi o de Henry Molaison (H. M.), paciente que sofria de um quadro de epilepsia que se intensificou ao longo de sua vida. Em 1953, aos 27 anos H. M. foi submetido a uma cirurgia de remoção de seu lobo temporal, que foi a região identificada como mais ativa durante suas crises epiléticas. Após a cirurgia, o paciente passou a apresentar um quadro grave de amnésia anterógrada, condição onde o indivíduo não é capaz de formar novas memórias episódicas, embora conserve a capacidade de adquirir memórias de procedimento, que são implícitas (NEVES *et al.*, 2008; KNIERIM, 2015).

Dentre as estruturas encontradas no lobo temporal, o hipocampo, em especial sua região dorsal (FANSELOW e DONG, 2010), destaca-se como um componente essencial da memória espacial (JARRARD, 1993; JACOBS e SCHENK, 2003; JARRARD *et al.*, 2004) e da memória de trabalho (OLTON e PAPAS, 1979; OLTON e FEUSTLE, 1981; KNOWLTON *et al.*, 1989) e, em humanos, também sabe-se que esta estrutura é fundamental para a memória de curto prazo e para a consolidação de memórias declarativas (EICHENBAUM, 1999; 2000; 2001; 2004; OPITZ, 2014; KNIERIM, 2015; SQUIRE *et al.*, 2015). Embora o hipocampo seja muito importante, ele não é a única estrutura responsável por esse processamento, de forma que sua conectividade com áreas corticais, por exemplo, é mais do que essencial para a memória de

trabalho, evocação, dentre outras. A remoção deste sistema hipocampal gera a amnésia anterógrada justamente porque esta estrutura está envolvida no processo de consolidação de memórias de curto prazo, que são lembradas de minutos a dias, em memórias de longo prazo, que podem ser evocadas após vários anos (GIAP *et al.*, 2000; SPIERS *et al.*, 2001; NEVES *et al.*, 2008; SQUIRE, 2009; SQUIRE e WIXTED, 2011; SQUIRE *et al.*, 2015).

A formação hipocampal em humanos apresenta três camadas celulares, e é uma eminência bilateral alongada e curva, situada no assoalho do corno inferior do ventrículo lateral, acima do giro parahipocampal e pode ser dividida em três regiões: giro denteado, hipocampo propriamente dito, subdividido em CA1, CA2 e CA3 e subículo, também chamado de complexo subicular (WITTER e AMARAL, 2004; NEVES *et al.*, 2008; FEMI-AKINLOSOTU *et al.*, 2021).

O hipocampo tem projeções no córtex pré-frontal e no hipotálamo. Para chegar ao hipocampo, a informação sensorial segue das áreas corticais de associação para o giro do cíngulo, atingem o córtex parahipocampal e chegam ao córtex entorrinal. Após o córtex entorrinal, os axônios da via perfurante realizam sinapse com as células granulares no giro denteado. Os axônios das células granulares (fibras musgosas), realizam sinapse com as células piramidais, na região CA3 do hipocampo. Os axônios das células piramidais de CA3 se bifurcam e um ramo deixa o hipocampo através do fórnice, enquanto o outro, chamado de colateral de Schaffer, realiza sinapse em CA1. As sinapses no giro denteado, CA3 e CA1 caracterizam o modelo trissináptico de conexão intrínseca da formação hipocampal. A partir de CA1, os estímulos atingem o subículo e retornam para o córtex entorrinal (figura 1) (HARRY e LEFEBVRE D'HELLEN COURT, 2003; WITTER e AMARAL, 2004; NEVES *et al.*, 2008; TURGUT e TURGUT, 2011).

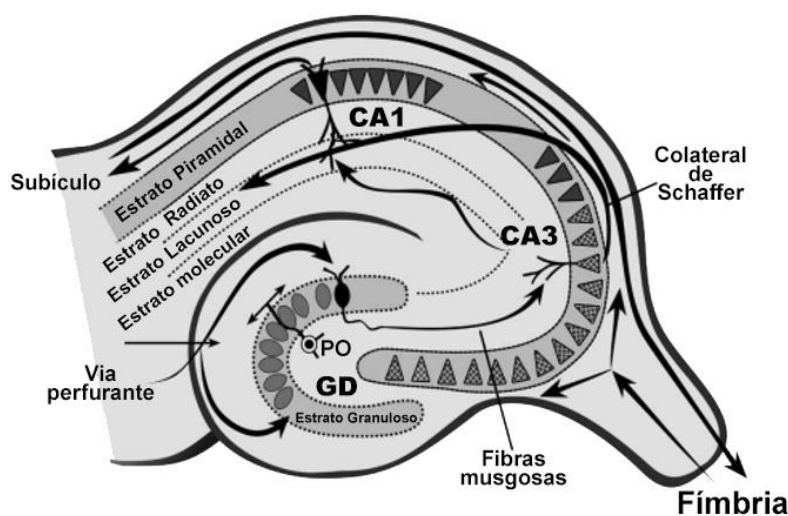


Figura 1: Esquema da formação hipocampal onde é possível observar a conectividade do circuito essencial da memória, assim como a organização de alguns estratos (camadas) hipocâmpais. Imagem adaptada (HARRY e LEFEBVRE D'HELLEN COURT, 2003).

Ao contrário do que se acreditava no século XX, experimentos em humanos e animais mostraram que algumas regiões do cérebro adulto ainda são suscetíveis a mudanças estruturais que se refletem em suas funções (SCHALLERT *et al.*, 2000). Estas mudanças estruturais e funcionais no adulto são geralmente chamadas de plasticidade neuronal (WARD, 2005). Uma das áreas mais suscetíveis à este fenômeno, dada a natureza e multiplicidade de suas atividades, é justamente o hipocampo (CHRISTIAN *et al.*, 2014). Diversos estudos caracterizaram a ocorrência de proliferação celular de linhagens neurais nesta região, em especial, na zona subgranular do giro denteado, onde são encontradas diversas células progenitoras (CHRISTIE e CAMERON, 2006).

Foi demonstrado que a proliferação celular do hipocampo tanto no período de desenvolvimento quanto no adulto é bastante sensível não só à fatores endógenos como a isquemia (BRIONES *et al.*, 2005), doenças neurais e transtornos de humor (TODA *et al.*, 2019), mas também a fatores ambientais (POWROZEK *et al.*, 2004; BARTSCH e WULFF, 2015; YAO *et al.*, 2016), como exercício físico (VAN PRAAG *et al.*, 1999), enriquecimento ambiental (GARTHE *et al.*, 2016) e a dieta (MATTSON *et al.*, 2003; KAPTAN *et al.*, 2015; POULOSE *et al.*, 2017; BAIK *et al.*, 2020). A proliferação celular hipocampal (DENG *et al.*, 2010; CHRISTIAN *et al.*, 2014; CAMERON e GLOVER, 2015; GROS *et al.*, 2015; MOSER *et al.*, 2015; MILLER e SAHAY, 2019; SNYDER, 2019; TODA *et al.*, 2019), assim como a neurogênese e integração de novos neurônios no hipocampo (JESSBERGER e KEMPERMANN, 2003; VADODARIA e JESSBERGER, 2013) e a ativação astrocitária (BEN MENACHEM-ZIDON *et al.*, 2011; ADAMSKY e GOSHEN, 2018; ADAMSKY *et al.*, 2018) são relevantes para a memória e a aprendizagem que, por sua vez, apresentam alta sensibilidade a fatores nutricionais (CAMPBELL e BEDI, 1989; AKITAKE *et al.*, 2015; PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2016).

Com o avanço da biologia molecular foi possível detectar modificações moleculares associadas à memória, como a expressão do gene imediato c-fos, codificador da proteína FOS, que atua como fator de transcrição (GALLO *et al.*, 2018). Essa proteína pode ser expressa transitoriamente em diversas regiões do encéfalo, incluindo o hipocampo (DA SILVA *et al.*, 2014), e possibilita a identificação da ativação neuronal de diversos sistemas (HOFFMAN *et al.*, 1993; HOFFMAN e LYO, 2002; KOVÁCS, 2008). Assim como a proliferação celular hipocampal, a expressão de FOS nesta região é importante para a formação de novas memórias (HERRERA e ROBERTSON, 1996; TANIMIZU *et al.*, 2018) e também é altamente sensível à estímulos ambientais (HERRERA e ROBERTSON, 1996; SAYIN *et al.*, 2014), incluindo a dieta (RUBY *et al.*, 2017).

Muitos estudos em roedores demonstraram que a restrição alimentar aplicada no adulto é capaz de aumentar a proliferação celular e a expressão de FOS no hipocampo, melhorar o desempenho em testes cognitivos, diminuir o estresse oxidativo e aumentar a longevidade (MATTSON *et al.*, 2003; BONDOLFI *et al.*, 2004; KUHLA *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2016; RUBY *et al.*, 2017; GÜLTEKIN *et al.*, 2018; MARTI-NICOLOVIUS e AREVALO-GARCIA, 2018; HADEM *et al.*, 2019), o que pode se dar pela redução da leptina circulante, diminuição de radicais livres, dentre outras vias (FONTÁN-LOZANO *et al.*, 2008; MORGAN *et al.*, 2017). Por outro lado, diversos estudos que aplicaram a restrição de alimentos nos períodos de desenvolvimento (embrionário, fetal, perinatal e púbere) observaram uma diminuição da proliferação celular no hipocampo e do desempenho cognitivo (MATOS *et al.*, 2011; AKITAKE *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2016), conforme os mecanismos já mencionados. Os dados favoráveis à restrição alimentar se pautam em indivíduos que tiveram todas as suas necessidades básicas previamente atendidas, de modo que estes dados não contemplam a aqueles que foram submetidos a condições desfavoráveis de privação alimentação durante o desenvolvimento. Ressalta-se que cada uma dessas pesquisas foi conduzida de modo isolado, de forma que o efeito da redução da dieta aplicada no adulto previamente submetido à restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação ainda não apresenta precedentes na literatura.

Além de preencher lacunas na literatura científica, trabalhos focados em um problema social tão relevante e prevalente quanto a fome, em especial nesta abordagem DOHaD, são extremamente importantes para a conscientização dos mais diversos órgãos sobre a necessidade de criação de políticas públicas que atendam populações desamparadas. As políticas públicas, aliás, podem e devem ser baseadas em evidências, assim, este trabalho endossa e defende a relevância dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável propostos pela ONU, debruçando-se majoritariamente nos objetivos 1, 2, 3 e 10, que correspondem à Erradicação da Pobreza, à Fome Zero, à Promoção de Saúde e Bem-Estar para todos, e à Redução das Desigualdades. É importante conhecer quais são as implicações da desnutrição precoce e seus mecanismos em todas as suas dimensões, além de verificar suas repercussões futuras e possíveis interações com determinados estilos de vida adotados pois entender o problema e sua interação com variáveis tardias poderão servir no futuro para um melhor atendimento e direcionamento de condutas de profissionais da saúde para com populações vulneráveis, além de servirem como um alerta para a necessidade de oferecer assistência e condições de vida decentes para todos. Os trabalhos de pesquisa básicos, utilizando animais experimentais, são um ponto de partida essencial para o direcionamento de pesquisas clínicas, abordagens em epidemiologia e ampliação das fronteiras do conhecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Memória e Hipocampo

2.1.1 Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a memória e o hipocampo de ratos Wistar submetidos a redução da dieta na fase adulta associada à programação por restrição alimentar durante a prenhez e lactação.

2.1.2 Específicos

1. Avaliar a locomoção, o perfil exploratório e ansiedade dos animais através do Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado;
2. Avaliar a memória de Reconhecimento através do Teste de Reconhecimento de Novo Objeto;
3. Avaliar a memória Espacial através do Teste de Localização de Objeto e do Labirinto de Barnes;
4. Mensurar dados biométricos para avaliação da magnitude do efeito das dietas aplicadas.
5. Quantificar o número de células expressando proteína FOS no hipocampo após realização de teste de Localização de Objeto;
6. Avaliar a citoarquitetura do hipocampo (densidade de neurônios e astrócitos);
7. Quantificar a neurogênese hipocampal por meio de imunorreatividade a doblecortina;

2.2 Preferência alimentar e Preferência à sacarose

Investigar o papel da programação por restrição alimentar durante a prenhez e lactação na preferência alimentar e preferência à sacarose de ratos na infância.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Todos os experimentos utilizaram animais de experimentação, não existindo método alternativo. Foi tomado o maior cuidado possível no planejamento e preparação dos experimentos para incrementar ao máximo as possibilidades de êxito e reduzir o número de animais utilizados. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu (protocolo CEUA nº 8789260620). Foram utilizados casais (machos e fêmeas) de ratos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar*, obtidos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção das proles como modelo experimental. Esta espécie, representativa dos mamíferos roedores, já foi utilizada em diversos estudos de proliferação celular no hipocampo após restrição alimentar, como mencionado anteriormente.

Inicialmente, os casais de roedores permaneceram no biotério setorial até atingirem idade reprodutiva. Após esse período, uma fêmea foi introduzida na caixa de um macho para acasalamento durante a noite. Na manhã seguinte, as fêmeas retornaram às suas caixas e foi realizada a coleta de lavado vaginal, com objetivo de verificar a presença de espermatozoides. Esse procedimento foi realizado por até 6 dias consecutivos, ultrapassando a duração do ciclo estral de ratos da linhagem *Wistar* (WESTWOOD, 2008), possibilitando que o acasalamento obtivesse êxito.

A presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerada como dia 0 de prenhez, determinando a transferência da fêmea para uma caixa individual. As fêmeas prenhes foram divididas em dois grupos experimentais: grupo programação controle (PC, N=14), com dieta normal *ad libitum* (Ração Presence ratos e camundongos, Invivo Nutrição e Saúde Animal LTDA., informações sobre composição básica e níveis de garantia no anexo 1) e grupo programação por restrição calórica (PR, N=17), que recebeu dieta com restrição de 50% da oferta de ração calculada em cada dia do período de prenhez e lactação em relação a curva de consumo do grupo controle, portanto, trata-se de uma redução da quantidade de alimento ofertada (restrição global), sem alterações das proporções de nutrientes ou da marca da ração. Durante a prenhez e lactação o peso e o consumo das matrizes foi acompanhado diariamente até o desmame no 21º dia pós-natal (DPN), sempre às 8 horas da manhã.

A unidade experimental é composta pela mãe, utilizando como critério de inclusão que a ninhada seja mista e composta por 8 filhotes, sendo 4 fêmeas e 4 machos, no intuito de evitar a influência do tamanho da ninhada no desenvolvimento da prole (WURTMAN e MILLER, 1976).

O dia do nascimento foi considerado DPN0 e no DPN1 foram avaliados, em cada prole, o número e o sexo dos neonatos a partir da observação da distância anogenital. Em caso de proles muito grandes, animais excedentes, machos e fêmeas, foram eutanasiados por decapitação, atendendo ao critério de inclusão. Nos casos em que não houve quantidade suficiente de um dos sexos, foi realizada adoção entre ninhadas. No DPN21, data correspondente ao desmame, foi confirmada a sexagem dos animais a fim de selecionar para o estudo, exclusivamente, animais machos. Este aspecto é importante para restringir a variável do ciclo estral, já que é bem descrita a influência do estradiol nos mecanismos de regulação central de ingestão alimentar, balanço energético, proliferação celular hipocampal e desempenho cognitivo (YAGI e GALEA, 2019). Após o desmame, as fêmeas foram eutanasiadas segundo as recomendações constantes na tabela 1 do anexo da resolução normativa nº37 do CONCEA (diretriz da prática de eutanásia) com solução anestésica composta

de Ketamina 10% (25mg/ml), Xilazina 2% (0,5mg/ml) e Acepromazina 1% (1mg/ml) diluída em água purificada, na dose de 3ml/kg (sobredose), por via intraperitoneal.

A partir do desmame, os machos das proles de ambos os grupos foram alojados em gaiolas (33x40x17cm), em duplas. Os animais tiveram livre acesso à água e ração, em biotério com temperatura controlada (21 a 22°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00h) até o DPN 60. Nesta fase foi mensurado o consumo de ração e o peso dos animais semanalmente, e estes dados foram utilizados para o cálculo do Índice de Eficiência Alimentar (Ganho de peso/consumo) e o Índice de Conversão Alimentar (Consumo/Ganho de peso), excetuando-se a data da realização do teste de preferência alimentar e preferência à sacarose, onde os animais foram alojados individualmente nas gaiolas e receberam uma opção alimentar diversa durante 3 dias. Os machos reprodutores foram utilizados para os procedimentos de padronização do tempo ideal de detecção da proteína FOS por imuno-histoquímica no

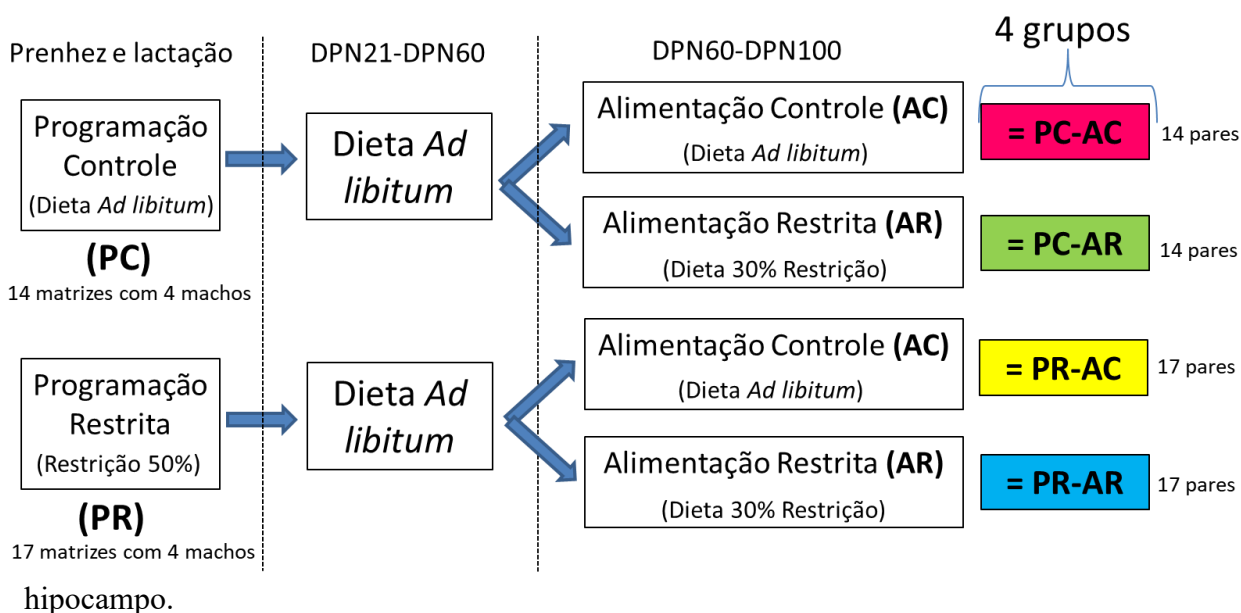


Figura 2: Esquema representativo da formação dos grupos experimentais.

Em cada grupo (PC e PR), os animais foram novamente divididos em dois grupos com relação à restrição alimentar na fase adulta: o grupo alimentação *ad libitum* ao longo de toda vida (AC) e o grupo restrição alimentar (AR), que recebeu dieta com redução de 30% da quantidade de ração em relação ao seu controle na fase adulta, após a maturação reprodutiva, dos 60 aos 100 dias de idade. A dieta nesta fase foi ofertada diariamente às 13 horas e sua composição foi a mesma da ração ofertada durante os períodos de prenhez e lactação. Assim, ao final do experimento foram analisados 4 grupos experimentais: PC-AC, PC-AR, PR-AC e PR-AR (Figura 2).

Visto que as ninhadas foram padronizadas com 4 machos, cada um dos grupos finais,

derivados de PC ou PR, recebeu 2 animais de cada mãe, de modo que havia 28 animais nos grupos PC-AC e PC-AR, e 34 animais nos grupos PR-AC e PR-AR. Apesar dessa quantidade, foram aproveitados os dados de apenas um animal de cada ninhada para cada tipo de análise comportamental realizada, afim de evitar pseudoréplicas, computando dados de 14 animais nos grupos PC-AC e PC-AR, e 17 animais nos grupos PR-AC e PR-AR. Assim, a distribuição dos animais nos grupos experimentais foi realizada de forma homogênea com relação a descendência, minimizando a possibilidade de efeito de ninhada.

Aos 30 dias, antes da segunda subdivisão dos grupos, os animais realizaram o teste de preferência alimentar. Aos 90 dias, durante a realização da segunda etapa de restrição alimentar, metade dos animais (sem utilização de irmãos, conforme descrito) foram avaliados no campo aberto, cruz elevada e labirinto de Barnes, enquanto aos 100 dias de idade, a outra metade realizou campo aberto, teste de reconhecimento de novo objeto (NORT) e teste de localização de objeto (OLT) e em seguida foram submetidos à eutanásia. (figura 3).

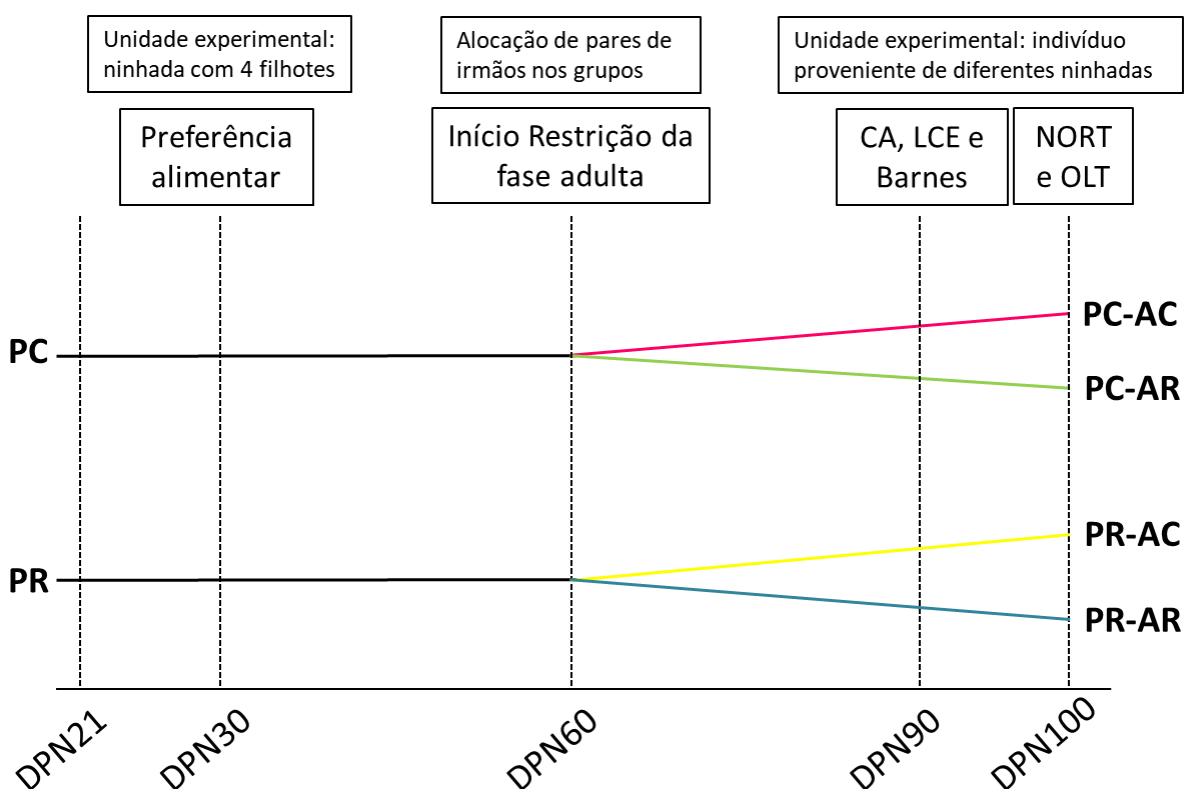


Figura 3: Linha do tempo da realização das intervenções e testes pós desmame.

3.2 Comportamento Alimentar

O teste de preferência alimentar consiste na oferta simultânea de ração padrão e de uma ração enriquecida. Ele serve para identificar a existência de preferência pela dieta enriquecida com base na quantidade consumida pelo animal (CARLIN *et al.*, 2019). Neste projeto foram

utilizadas quatro dietas distintas: dieta padrão (DP), dieta hiperglicídica (DHG), dieta hiperlipídica (DHL) e dieta hiperproteica (DHP), oferecidas na forma de misturas em pó (figura 4).

A DP era composta apenas pela ração em pó padrão para ratos e camundongos (63,5% de carboidratos, 22% de proteínas e 4,5% de gorduras, com valor calórico de 3825kcal/kg) (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA). A DHG era composta, a cada 100g, de 62g de ração padrão em pó e 38g de sacarose (77,37% de carboidratos, 13,64% de proteínas e 2,79% de lipídeos, com valor calórico de 3891,5 kcal/kg). A DHL, 62g de ração e 38g de pó para preparação de creme tipo chantilly (53,43% de carboidratos, 17,25% de proteínas e 16,85% de lipídeos, com valor calórico de 4518,5 kcal/kg). A DHP, 62g de ração padrão em pó, 25g de caseína e 13g de amido de milho (50,42% de carboidratos, 38,64% de proteínas e 3,29% de lipídeos, com valor calórico de 4076,5 kcal/kg). O teste de preferência à sacarose consiste na oferta simultânea de uma garrafa de água comum e uma garrafa de sacarose à 4% e pode evidenciar diferenças no desenvolvimento dos circuitos dopaminérgicos ao identificar o comportamento similar à anedonia (VUCETIC *et al.*, 2010; GIACOBBO *et al.*, 2020).

Para a realização destes testes, aos 30 dias de vida os animais foram alojados individualmente nas gaiolas e submetidos a um jejum de 12 horas. A unidade experimental foi composta pela ninhada, portanto, cada macho da prole realizou um teste de preferência alimentar pelo oferecimento simultâneo de dieta padrão e um tipo de dieta enriquecida (figura 4): DHG, DHP ou DHL, cujo consumo foi mensurado após 1h, 12h e 36h após a primeira apresentação do alimento, iniciando-se às 19h, quando ocorre a troca para o ciclo escuro (figura 5). No momento da mensuração após 12h de consumo, os potes de ração tiveram suas posições trocadas na caixa do animal para evitar possíveis vieses de preferência de local. O quarto macho de cada ninhada, por sua vez, realizou o teste de preferência à sacarose, cujo consumo foi mensurado 24h e 48h após a primeira oferta, iniciando às 7h da manhã. O macho que realizou a preferência à sacarose não realizou jejum, tampouco privação hídrica. A garrafa de água e sacarose também tiveram suas posições trocadas após 24 horas.

O consumo foi medido pela diferença de peso da ração ou volume de água e solução de sacarose antes e depois da oferta. Os dados foram expressos em peso bruto ou coeficiente preferência, cujo cálculo foi feito conforme a razão $CP=DE/CT$, onde CP=coeficiente de preferência, DE=dieta enriquecida e CT=consumo total (enriquecida + padrão).



Figura 4: Apresentação da Dieta Padrão e Dieta Enriquecida na caixa de teste para cada animal.

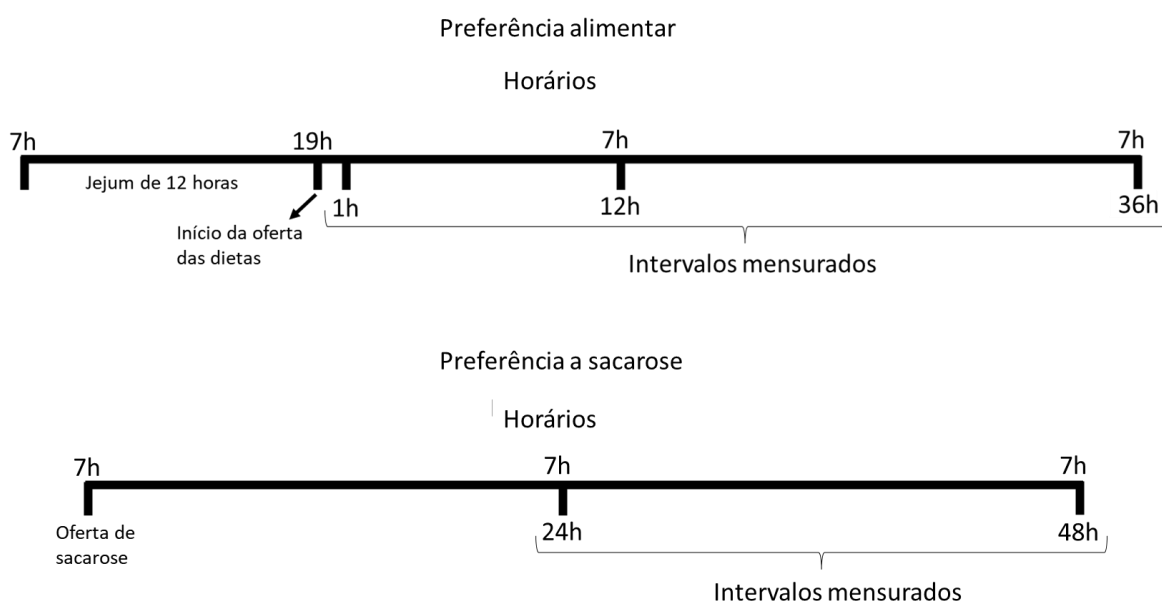


Figura 5: Cronograma de realização dos testes de preferência alimentar e preferência a sacarose.

3.3 Testes comportamentais

No DPN90, os animais de cada um dos 4 grupos (provenientes de diferentes ninhadas) foram submetidos ao Campo Aberto, para avaliação da exploração e mobilidade; ao Labirinto em Cruz Elevada, para avaliação da ansiedade (que é um fator relevante para o desempenho cognitivo) e ao Labirinto de Barnes, um teste comportamental para avaliação de memória espacial e aprendizagem. No DPN100 os irmãos destes animais que realizaram o labirinto de barnes, submetidos aos mesmos tipos de restrição, foram submetidos ao Teste de Localização de Objeto e ao Teste de Reconhecimento de Novo Objeto. Todos estes testes apresentam a

vantagem de não necessitar de reforço externo como recompensas alimentares, e não requerem jejum para sua execução (MARKEL *et al.*, 1989; HATTIANGADY *et al.*, 2014; VOGEL-CIERNIA e WOOD, 2014; DENNINGER *et al.*, 2018; GAWEL *et al.*, 2019; KRAEUTER *et al.*, 2019), interferindo o mínimo possível no tratamento a que os animais estarão sendo submetidos neste estudo.

3.3.1 Campo Aberto

O campo aberto é um teste de simples execução largamente utilizado. Ele consiste em observar o comportamento do animal em uma única exposição numa arena. Este teste serve para avaliação do comportamento exploratório, condição geral, mobilidade, e, quando combinado com outros testes comportamentais, ajuda a identificar comportamentos correspondentes à ansiedade (MARKEL *et al.*, 1989; SCHMITT e HIEMKE, 1998; PRUT e BELZUNG, 2003; BĂDESCU *et al.*, 2016; MILLER *et al.*, 2021).

O Campo aberto foi realizado com todos os animais envolvidos em testes comportamentais para que a mobilidade e condição geral dos animais pudessem ser verificadas, no intuito de garantir que não haja comprometimento do desempenho nos testes posteriores (INHASZ KISS *et al.*, 2013). Nesta tarefa os animais tiveram 5 minutos para explorar livremente uma arena redonda com $97 \times 32,5$ cm (diâmetro x altura) com marcação de círculos concêntricos divididos em sessões por linhas simétricas (Figura 6). Além da mobilidade, também foi mensurada, através do aplicativo *Countee*, a deambulação, número de sessões onde o animal insere as 4 patas, discriminando centro e periferia; a imobilidade, tempo em segundos que o animal não apresenta atividade motora; a auto-limpeza, tempo que o animal realizou essa atividade e o levantar/inclinação alta, número de vezes que o animal permaneceu em seus membros posteriores ou encostado na parede com as patas dianteiras, em pé sobre os membros posteriores (LEGER *et al.*, 2013; KUNIISHI *et al.*, 2017; LUEPTOW, 2017; STURMAN *et al.*, 2018).



Figura 6: Animal posicionado no centro da arena de campo aberto. Na arena é possível visualizar a demarcação das sessões concêntricas utilizadas para avaliação de deambulação.

3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em Cruz Elevado consiste em colocar um animal num aparato elevado em formato de cruz que apresenta dois braços fechados em lados opostos e dois braços abertos. Ele foi desenvolvido para identificação de comportamento de tipo ansioso, sendo muito utilizado em estudos de drogas ansiolíticas (KULKARNI e SHARMA, 1993; COLE e RODGERS, 1995; HELDT *et al.*, 2009).

Esse teste é baseado no comportamento exploratório de locais novos e na observação de respostas a situações que poderiam provocar perigo. Ele consiste em analisar o grau de aversão do animal aos braços abertos, em conflito com o comportamento exploratório, já que ambientes abertos, sem proteção lateral, são naturalmente aversivos para o roedor, de modo que é esperado que animais em condição de ansiedade interajam mais com os braços fechados do aparelho (KRAEUTER *et al.*, 2019).

Cabe ressaltar que a ansiedade e o estresse são fatores muito relevantes a ser considerados quando há proposta de fazer uma avaliação cognitiva. O estresse pode ser um potente motivador em alguns testes comportamentais ou um interferente na recuperação de memórias, modificando inclusive a forma que o animal interage com as tarefas propostas, podendo ser um viés para a interpretação de alguns resultados (ROBERTSON, 2002; ROOZENDAAL *et al.*, 2009; ROOZENDAAL e MCGAUGH, 2011; DE QUERVAIN *et al.*, 2019).

Os animais foram colocados no centro do Labirinto em Cruz Elevado para livre exploração durante 5 minutos (Figura 7). A tarefa foi filmada e posteriormente analisada utilizando o Aplicativo Countee, onde foram obtidas as informações referente à Número de entradas no braço aberto, Tempo de permanência no Braço aberto, número de entradas no braço fechado, tempo de permanência no braço fechado e Head Dips (número de vezes que o animal olha para o chão estando no braço aberto).



Figura 7: Animal posicionado no centro do Labirinto em Cruz Elevado.

3.3.3 Labirinto de Barnes

O labirinto de Barnes é um teste largamente utilizado para avaliação da curva de aprendizagem e memória espacial em ratos e camundongos. O teste consiste em expor os animais a uma plataforma circular contendo diversos buracos periféricos, sendo que em um desses buracos haverá uma caixa de escape oculta. Esse teste se baseia na preferência natural de roedores por lugares escuros e pouco expostos. A plataforma deve ser bastante iluminada para instigar os animais a entrar na toca. Também deve-se utilizar pistas espaciais para que o animal tenha condições de se orientar e aprender a localização da caixa de escape (BARNES, 1979; HARRISON *et al.*, 2006). Este teste é bastante versátil, possibilitando avaliação da curva de aprendizagem, retenção de memória de longo prazo, flexibilidade cognitiva, dentre outros, e é uma alternativa interessante ao labirinto aquático de Morris por não expor os animais à uma condição que eles não são comumente expostos em seu ambiente natural, dado que são animais terrestres. Além disso, sua execução não requer jejum e nenhum tipo de recompensa alimentar, sendo, portanto, adequado ao objetivo deste projeto (GAWEL *et al.*, 2019).

Os animais foram manipulados pelo experimentador para redução dos níveis de estresse e foram acomodados na sala adjacente a de realização do teste com 1 hora de antecedência. Todos os testes ocorreram na fase clara do ciclo circadiano, no período da manhã.

O labirinto de Barnes utilizado consiste em uma plataforma circular branca de 125 cm de diâmetro, com 20 orifícios de 10 cm de diâmetro cada. Em um dos orifícios encontra-se o alvo, uma caixa de escape preta colocada embaixo da plataforma e invisível para o animal em teste, enquanto os demais orifícios permanecem tampados com material da mesma cor da caixa de escape, de modo que o animal não consegue discernir visualmente o alvo (Figura 8). A plataforma deve ser bem iluminada e na sala de testes são colocadas pistas externas de diferentes formatos e cores nas 4 paredes para servir de orientação espacial (HARRISON *et al.*, 2006).

Para realização deste teste optamos pelo protocolo de avaliação de retenção da memória, que consiste em 14 dias com três etapas: habituação, treino de aquisição e retenção. No primeiro dia, uma hora depois do campo aberto, ocorreu a fase de habituação ao labirinto de Barnes, em que os animais, individualmente, puderam explorar o labirinto livremente por 2 minutos, ou até encontrar a caixa de escape, onde ele permaneceu por 30 segundos. Caso o animal não tenha encontrado a caixa em até 2 minutos, ele foi gentilmente conduzido até o local pelo experimentador. No segundo dia, iniciou-se a fase de treino/aquisição. Nesta fase, foi realizada uma sessão de treinos diários, durante 5 dias. Em cada sessão, os animais foram colocados na arena 3 vezes (3 tentativas), com intervalos de 20 minutos, e foram retirados após entrada na caixa de escape, com limite máximo de exploração de 4 minutos. Durante esta fase,

nos casos em que o animal não entrou espontaneamente na na caixa em até 4 minutos, ele foi conduzido pelo experimentador. Finalizada a fase de treino, o teste de retenção foi realizado após 7 dias, com uma única exposição de no máximo 4 minutos (GAWEL *et al.*, 2019).

Os animais foram colocados no centro do aparato, sempre cobertos por uma caixa para aleatorização da orientação inicial do animal a cada teste. O equipamento foi higienizado com álcool a 10% entre cada exposição. Além disso, a plataforma com os buracos foi girada de forma aleatória a cada teste para minimizar a possibilidade de uso de pistas olfatórias, mantendo a caixa de escape na mesma posição em relação às pistas espaciais (ROSENFELD e FERGUSON, 2014).

Todos os testes foram gravados para posterior análise. A análise foi feita no Software MATLAB R2020a (versão 9.8.0. 1323502), através do plugin ZebTrack, onde foram inseridos dados referentes ao diâmetro do aparato (considerando a distorção do ângulo de imagem). Através do programa foram obtidos resultados de trajeto percorrido (distância) para atingir a caixa alvo, gráfico de posição e tempo de permanência no quadrante alvo. O quadrante alvo corresponde à caixa de escape (toca) mais dois buracos tampados à esquerda e à direita, totalizando 5 dos 20 buracos presentes.

Outras medidas foram obtidas manualmente, como a latência (tempo em segundos) para atingir o alvo, estratégia de busca da caixa, a magnitude do primeiro erro e o número de erros até entrada na caixa de escape no dia do teste de retenção. A estratégia de busca foi agrupada em três categorias, sendo elas: a Busca Direta, ir diretamente para a caixa de escape com 3 ou menos erros; Busca Seriada, viajando pela periferia do labirinto, de orifício em orifício, até que a caixa de fuga seja localizada; ou Busca Aleatória, cruzando o centro do labirinto várias vezes para verificar vários buracos de forma aleatória (Figura 8). A magnitude do primeiro erro consiste em uma pontuação diretamente proporcional à grandiosidade do erro da primeira tentativa de encontrar a toca que o animal faz no momento do teste de retenção, ou seja, no caso em que o animal vai direto para a caixa alvo, ele pontua 1, caso ele vá para um dos orifícios vizinhos (à direita ou à esquerda da toca), ele pontua 2, e assim vai sendo somado 1 número a cada orifício a mais de distância da caixa de escape, de modo que quando o animal vai primeiro para o orifício diametralmente oposto, ele recebe a atribuição de 10 pontos. Durante a fase de aquisição e teste de retenção, nos casos em que o animal não localizou a caixa de escape dentro do tempo máximo estipulado, os dados de latência foram atribuídos como 240 segundos, correspondendo aos 4 minutos de prova. Nas situações em que o animal caiu ou saltou do labirinto, houve recuperação do animal, que foi colocado de volta no labirinto em até 10 segundos.

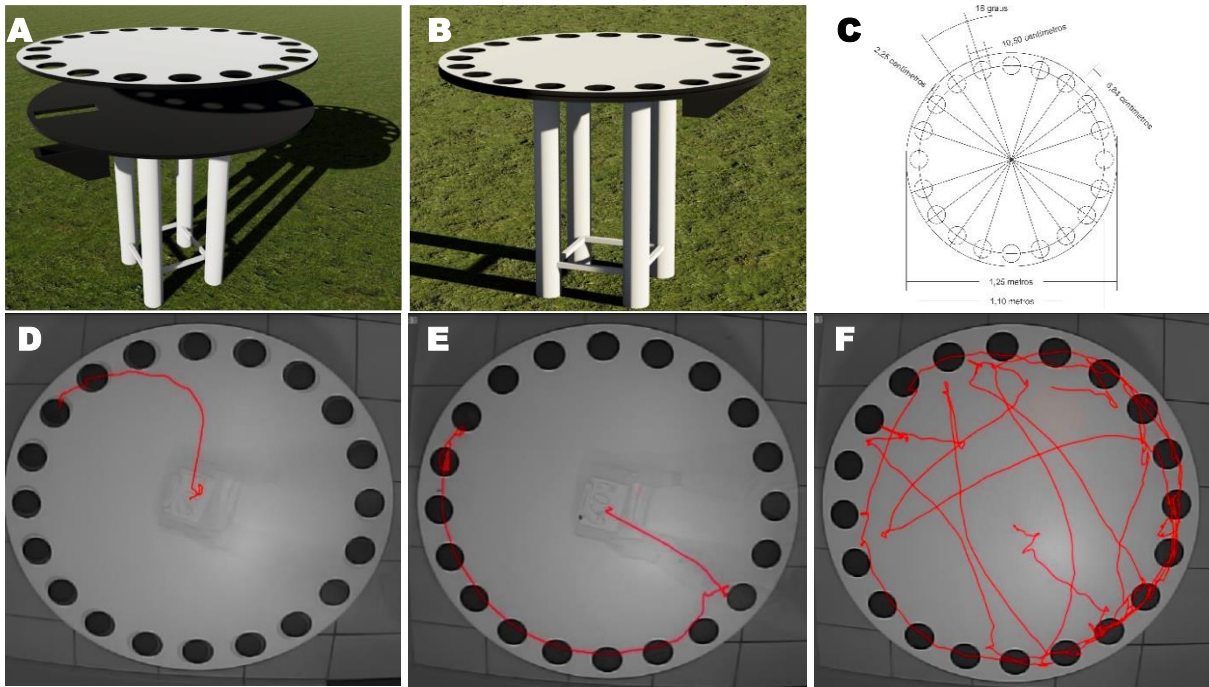


Figura 8: Esquemas do Labirinto de Barnes e estratégias de busca da caixa de escape utilizadas pelos animais. Em A, Esquema das partes do labirinto de Barnes. Em B, esquema do labirinto montado pronto para o uso. Em D, esquema das medidas da plataforma do labirinto. Em D, está caracterizada a direta; em E, a busca seriada e em F, a busca aleatória.

3.3.4 Teste de Reconhecimento de Novo Objeto (NORT)

Assim como a tarefa de Localização de Objeto, o teste de Reconhecimento de Novo Objeto apresenta execução simples e não requer reforço externo adicional (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Diferentemente do teste de localização de objeto, essa tarefa não avalia a memória espacial, mas sim a memória de reconhecimento de objetos, que depende de uma variedade de regiões cerebrais e não apenas do hipocampo, embora existam fortes indícios de que esta estrutura também esteja envolvida (COHEN *et al.*, 2013; COHEN e STACKMAN, 2015; TANIMIZU *et al.*, 2018). É uma tarefa comumente usada para avaliar a função da memória geral em roedores (AKKERMAN *et al.*, 2012) e foi inicialmente desenvolvida para ratos e posteriormente adaptada para diversas outras espécies, incluindo animais maiores como cães (CALLAHAN *et al.*, 2000; HEGAB *et al.*, 2018).

Sua execução consiste em aclimatar um rato a uma arena de testes e depois permitir que ele investigue 2 objetos livremente. O rato é então retirado da arena e após um intervalo, denominado intervalo de retenção, o animal é reintroduzido na arena para explorar livremente novamente. Nesta oportunidade um dos objetos é substituído por outro, mantendo a mesma localização. Em geral, os ratos preferem a novidade, portanto, caso eles consigam se lembrar da exposição anterior, na fase de teste eles tendem a passar mais tempo investigando o objeto novo (AKKERMAN *et al.*, 2012; LEGER *et al.*, 2013; DENNINGER *et al.*, 2018).

O intervalo de retenção deste teste é adaptável para estudar diferentes etapas de

consolidação da memória, ou seja, pode-se utilizar um tempo de retenção variável entre 10 minutos e 24 horas para avaliar memórias de curto ou longo prazo (AKKERMAN *et al.*, 2012; AKKERMAN *et al.*, 2014; HALL *et al.*, 2016; LUEPTOW, 2017). Diversos estudos mostram que os animais em condições normais perdem consideravelmente a capacidade de reconhecimento dos novos objetos quando se aplicam intervalos de retenção maiores que 24h, assim, em geral, os protocolos com intervalo de retenção longos são empregados nas situações em que se pretende avaliar aprimoramento de memória ou sua consolidação efetiva (ENNACEUR e MELIANI, 1992).

3.3.5 Teste de Localização de Objeto (OLT)

O teste de Localização de Objeto é um teste de execução simples capaz de avaliar o reconhecimento da alteração de posição de objetos que está associado à memória espacial, uma das principais atribuições do hipocampo em roedores (MENDEZ *et al.*, 2015; HEGAB *et al.*, 2018). Esta tarefa conta com a preferência intrínseca do animal por novidade, sem reforço externo adicional e, portanto, pode evitar complicações associadas a respostas emocionais diferenciais (HATTIANGADY *et al.*, 2014; VOGEL-CIERNIA e WOOD, 2014).

Este protocolo consiste em aclimatar o rato a uma arena de testes e, em seguida, permitir que ele investigue 2 objetos com referência a pistas ambientais espaciais. O rato é então retirado da arena, e um dos objetos é movido. Após um intervalo de tempo, o animal é reintroduzido na arena para explorar livremente. Em geral, os ratos preferem a novidade, e caso se lembrem da localização dos objetos em sua exposição inicial, eles tenderão a passar mais tempo investigando o objeto movido (CAI *et al.*, 2012). Animais com lesões hipocâmpais têm prejuízo do aprendizado contextual espacial e, consequentemente, não demonstram preferência por objetos (Figura 9) no novo local (DENNINGER *et al.*, 2018). O intervalo de tempo entre as apresentações espaciais dos objetos pode ser adaptado para avaliação de retenção de memória de curto ou longo prazo (WESTBROOK *et al.*, 2014; HALL *et al.*, 2016).

3.3.5.1 Execução dos testes de Reconhecimento e Localização de Objeto

Os animais foram manipulados previamente à habituação para redução dos níveis de estresse e estiveram acomodados próximo à sala de realização do teste com 1 hora de antecedência. Todos os testes ocorreram na fase clara do ciclo circadiano, no período da manhã e foram filmados para posterior análise. Para a realização destes testes, os animais exploraram livremente uma arena de campo aberto redonda 97 × 32,5 cm (diâmetro x altura), cercada por pistas espaciais. No início de cada teste, o animal foi posicionado individualmente no centro da arena.

O primeiro contato do animal com a arena de campo aberto, sem nenhum objeto no seu interior, foi caracterizada como fase de habituação, que teve duração de 5 minutos e serviu para avaliação da mobilidade e condição geral do animal para realização dos testes posteriores.

O treinamento foi realizado 50 minutos após a habituação. Nesta fase o animal foi recolocado na arena onde havia 2 objetos idênticos para livre exploração durante 10 minutos, e em seguida o animal foi removido da arena (Figura 10). Após 50 minutos de tempo de retenção, um dos objetos foi substituído por um objeto diferente e o animal foi reinserido na arena para realização do teste, que consistiu em outra exploração de 10 minutos. Este tempo de retenção serviu para caracterizar a memória de curto prazo. Durante o teste de Reconhecimento de Novo Objeto foi mensurado o tempo em segundos e a frequência de interação com cada objeto.

Para avaliação da memória de longo prazo, o teste de Reconhecimento de Novo Objeto foi realizado novamente, nos mesmos animais, com um intervalo de retenção de 24 horas a partir do último. Nesta tarefa, os animais retornaram à arena para nova exploração por 10 minutos, e o objeto trocado no teste anterior foi novamente substituído por um terceiro tipo de objeto (Figura 10), mantendo novamente o objeto que não foi trocado anteriormente (GODINHO *et al.*, 2016). Após um intervalo de 50 minutos desde o último teste de Reconhecimento de Novo Objeto, o objeto nunca trocado nas explorações anteriores foi movido (Figura 10) e o animal retornou à arena por mais 10 minutos para realização do teste de Localização de Objeto para avaliação da memória espacial (MENDEZ *et al.*, 2015). Durante o teste de Localização de Objeto também foi mensurado o tempo em segundos e a frequência de interação com cada objeto.

O critério de inclusão dos animais foi o mínimo de uma interação com cada objeto a cada sessão. O tempo de exploração de 10 minutos foi escolhido para abranger animais que apresentem um perfil exploratório menos intenso, diminuindo o número de animais a serem desconsiderados nos testes (LUEPTOW, 2017). Os objetos utilizados nestes protocolos eram fixados à arena impedindo sua movimentação durante a exploração do animal. Todos os objetos utilizados nos testes, assim como a arena, foram devidamente higienizados com álcool 10% entre cada uma das fases do protocolo para minimização de odores que possam interferir nos resultados. Os dados para análise foram obtidos pelo aplicativo Multi-timer e exportados como arquivo *.CSV, para o cálculo em cada uma das sessões de teste, do Coeficiente de exploração pela razão $N/(N+F)$, onde N corresponde ao tempo ou frequência de exploração do Objeto Novo e F corresponde ao tempo ou frequência de exploração do Objeto Familiar.



Figura 9: Objetos utilizados nos testes NORT e OLT, da esquerda para direita: A, A2, B e C.

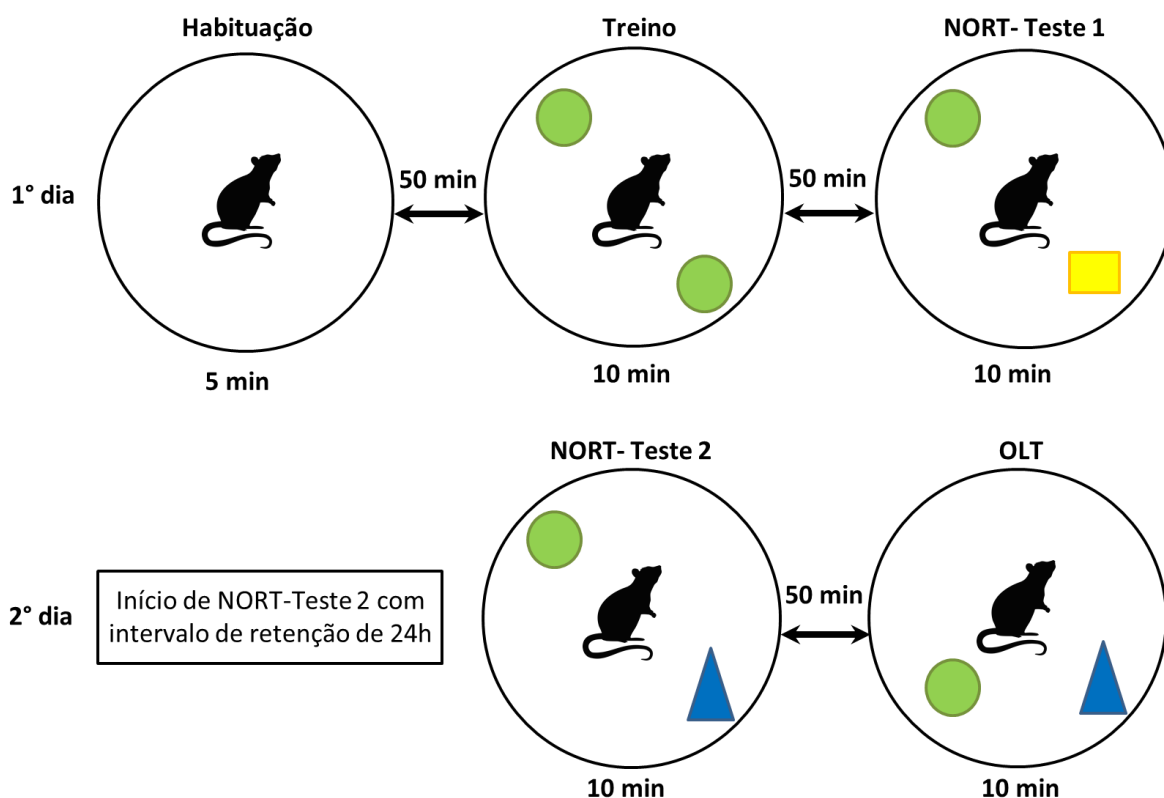


Figura 10: Configuração da arena de testes comportamentais para avaliação da memória (NORT e OLT). No primeiro círculo está ilustrada a fase de habituação. No círculo intitulado Treino consta a primeira apresentação, com 2 objetos idênticos (A e A2), em NORT – Teste 1 está a segunda sessão, após 50 minutos, com a substituição do objeto A2 pelo objeto B, em NORT – Teste 2 está a terceira sessão, após 24 horas, com a substituição do objeto B pelo objeto C, e em OLT está o teste de Localização de Objeto, 50 minutos após a sessão 3, onde o objeto A foi movido.

3.4 Análises morfológicas

3.4.1 Preparo de material biológico

Os animais que realizaram o Teste de Localização de Objeto foram eutanasiados após esta tarefa. O intervalo de tempo entre teste comportamental e a eutanásia do animal foi definido conforme padronização do protocolo para verificar o momento de maior expressão da proteína

FOS no hipocampo, que é transitória (KOVÁCS, 2008; MENDEZ *et al.*, 2015). A padronização do intervalo foi realizada com os reprodutores machos utilizados para o acasalamento com as matrizes. Nesta padronização, dez animais foram submetidos ao Teste de Localização de Objeto e dois deles foram eutanasiados em intervalos de tempo de 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após o teste. Depois da análise destes dados, os intervalos de tempo que apresentaram os melhores resultados foram de 60 e 75 minutos, sendo determinado o intervalo de 70 minutos para realização deste projeto.

A intervenção para a eutanásia de todos os animais foi realizada sob anestesia profunda segundo as recomendações constantes na resolução normativa nº37 do CONCEA (diretriz da prática de eutanásia) com de solução anestésica composta de Ketamina 10% (25mg/ml), Xilazina 2% (0,5mg/ml) e Acepromazina 1% (1mg/ml) diluída em água purificada, na dose de 3ml/kg (sobredose), por via intraperitoneal. Antes de se iniciar qualquer procedimento ou imobilização do animal, foi comprovada a ausência dos reflexos córneo-palpebral e de retirada do membro como sinal de anestesia eficaz.

Foram perfundidos quatorze animais de cada grupo, um representante da prole de cada matriz, com solução salina 0,9% (30ml/minuto), seguida de solução fixadora de formaldeído a 4%, recém-preparada a partir de paraformaldeído, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, durante 30 minutos. No dia da eutanásia, imediatamente antes da perfusão, foram avaliados o peso corporal e o comprimento naso-anal dos animais.

Após a perfusão, estes animais ficaram em repouso por pelo menos 30 minutos para aprimorar a fixação do encéfalo. Amostras de pêlo foram obtidas na região da coxa dos animais e em seguida foram coletados e pesados os tecidos adiposos visceral, retroperitoneal, periepídídimal e o encéfalo, por meio de craniotomia dorsal. Amostras de cerca de 100 miligramas de pêlos foram colocadas individualmente em tubos de vidro e preparadas em lavagem com metanol e clorofórmio (1/2). Para esta lavagem, 1 ml de metanol foi adicionado e o material ficou 5 minutos em agitador orbital, em seguida foi adicionado 2 ml de cloroformio e o material foi agitado por mais 5 minutos (RIOUX *et al.*, 2019). Depois desse período a amostra ficou em repouso por 2 horas e depois foi colocada em papel filtro para descarte dos reagentes, onde foi lavada 2 vezes com água destilada. Após essa etapa, os pêlos foram recolhidos com pinça e colocados em placa de petri para secagem em estufa por 48 horas. Após a secagem, os pêlos foram cortados com tesoura e cerca de 500 a 600 microgramas do material foram acondicionados em cápsulas de estanho, e em seguida as razões isotópicas estáveis de carbono (13 C) e nitrogênio (15 N) foram quantificadas por espectrofotometria (Equipamento: Flash EA - Delta V). Essa análise de pêlos pode ser utilizada como indicador de alterações

nutricionais (O'REGAN *et al.*, 2008).

Os encéfalos coletados foram pesados individualmente, divididos em três blocos por duas secções coronais (uma ao nível da ponte e outra ao nível do quiasma óptico) com o auxílio de uma matriz para encéfalos (RBM-4000C, ASI Instruments) e pós- fixados na mesma solução fixadora durante uma noite a 4°C. Posteriormente, os blocos foram transferidos para solução de tampão fosfato 0,1M com 30% de sacarose para crioproteção por no mínimo 48 horas, até o momento da microtomia.

O bloco contendo o hipocampo foi congelado e cortado no plano coronal em secções de 30µm de espessura com um micrótomo de deslizamento (Leica SM2010R) equipado com platina congeladora (BFS-30MP, Physiotemp Inc.). Os cortes foram recolhidos, sequencialmente, em uma série de 10 frascos preenchidos com solução anti-congelante, de maneira que o intervalo entre os cortes consecutivos em cada frasco é de 300µm. As séries de cortes foram armazenadas a - 20°C. Todas as substâncias tóxicas foram manipuladas em uma capela extratora de gases, na qual foram preparados os fixadores e perfundidos os animais.

Os animais que foram direcionados para realização do labirinto de Barnes, após a finalização do teste, foram submetidos a um jejum de 5 horas e tiveram seu sangue coletado por punção da cauda para dosagem da concentração sanguínea de glicose. A dosagem de glicose no sangue (glicemia) foi realizada utilizando um glicosímetro (FreeStyle Freedom Lite, Abbot®), com valores de concentração expressos em mg/dL. Depois disso estes animais passaram a receber uma alimentação *Ad libitum* e foram direcionados para outro projeto de pesquisa.

3.4.2 Estudo da imunorreatividade ao neuN, Doublecortina, FOS e GFAP

Foram empregados protocolos de imuno-histoquímica para identificar a imunorreatividade ao neuN, Doublecortina, FOS e GFAP no hipocampo dorsal. Para estudo morfológico, foram analisados de forma aleatória, os prosencéfalos de 5 animais de cada grupo experimental. Nos animais selecionados foram utilizadas 4 séries de cortes: uma para neuN, para inferência da quantidade de neurônios maduros; uma para doublecortina, para identificação dos precursores neuronais; uma para FOS, para avaliação da ativação neuronal; e uma para marcação de GFAP, para contabilizar o número de astrócitos maduros no hipocampo.

Inicialmente, os cortes histológicos foram lavados em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (TF), passando à inibição da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 3% em TF. Posteriormente, os cortes foram lavados em TF e tampão Tris 0,05M com Triton-X100 0,25% em salina pH 7,6 (TBS-TX), a seguir incubados em solução para bloqueio da marcação inespecífica contendo soro normal de cabra (#S1000, Vector Laboratories) a 2% em TBS-TX.

Finalizando a primeira etapa do protocolo, os cortes foram incubados em solução de anticorpo primário em TBS-TX por 48h, em temperatura de 4°C e sob constante agitação de acordo com cada protocolo: anti-GFAP (feito em coelho, #AB5804, Millipore, 1/6.000), anti-neuN (feito em camundongo, #MAB377, Millipore, 1:1000), anti-doublecortina (feito em cobaia #AB2253, Milipore, 1:20.000) ou anti-FOS (feito em coelho, #PC38, Calbiochem, 1/10.000). Após as 48 horas de incubação, os cortes foram lavados em TBS-TX 0,05M pH 7,6 e incubados em anticorpo secundário biotinilado espécie específico de acordo com o anticorpo primário utilizado, anti-IgG de coelho (#BA-1000, Vector Laboratories) ou anti-IgG de camundongo (#BA-9200, Vector Laboratories) ou anti IgG de cobaia (#106-035-003, Jackson ImmunoResearch), produzido em cabra, na concentração de 1/200, por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir os cortes foram lavados em TBS-TX e incubados em complexo avidina-biotina peroxidase (Vectastain ABC Kit, PK-4000), diluído em TBS-TX a 1/200, por 2 horas em temperatura ambiente. Esse método baseia-se na grande afinidade que a molécula de avidina tem pela molécula de biotina, com constante de dissociação na ordem de 10^{-15} (HSU *et al.*, 1981).

Em seguida, os cortes foram lavados em TBS-TX e em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0. Finalmente, a peroxidase unida ao complexo ABC é evidenciada pela reação de peróxido de hidrogênio, utilizando como cromógeno o 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto intensificado com níquel amônio sulfato (DAB-Ni), que gera um produto de reação estável de cor negra (HSU e SOBAN, 1982).

Após o processo de imuno-histoquímica, os cortes foram transferidos para uma solução de gelatina 0,4%, em tampão Tris-HCl 0,05M, e montados em lâminas de vidro sequencialmente, de caudal para rostral e as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando DPX® (#44581 Sigma-Aldrich) como meio de montagem. Todas as substâncias tóxicas foram manipuladas em uma capela extratora de gases, nas quais foram realizadas as reações imuno-histoquímicas com DAB e manipuladas substâncias para desidratação e montagem das lâminas para microscopia óptica.

3.4.3 Forma de análise dos resultados morfométricos

A análise morfométrica foi realizada nas séries de cortes processadas para os protocolos de imuno- histoquímica. Estão sendo analisadas as regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo dorsal (figura 11). Para cada uma destas regiões foram capturadas imagens de quatro cortes seriados, regularmente espaçadas com intervalos de 300 µm, tendo como terceiro nível de caudal para rostral a referência de plano coronal -3,24 mm, caudalmente ao bregma

(PAXINOS e WATSON, 2005). Para estudar a imunorreatividade à doublecortina e FOS, foi realizada uma análise semiquantitativa por meio da contagem de células imunorreativas. Para análise da imunorreatividade ao neuN e GFAP, foi medida a densidade óptica média. Para cada caso experimental os valores das regiões de interesse foram calculados pela média aferida entre os quatro cortes estudados.

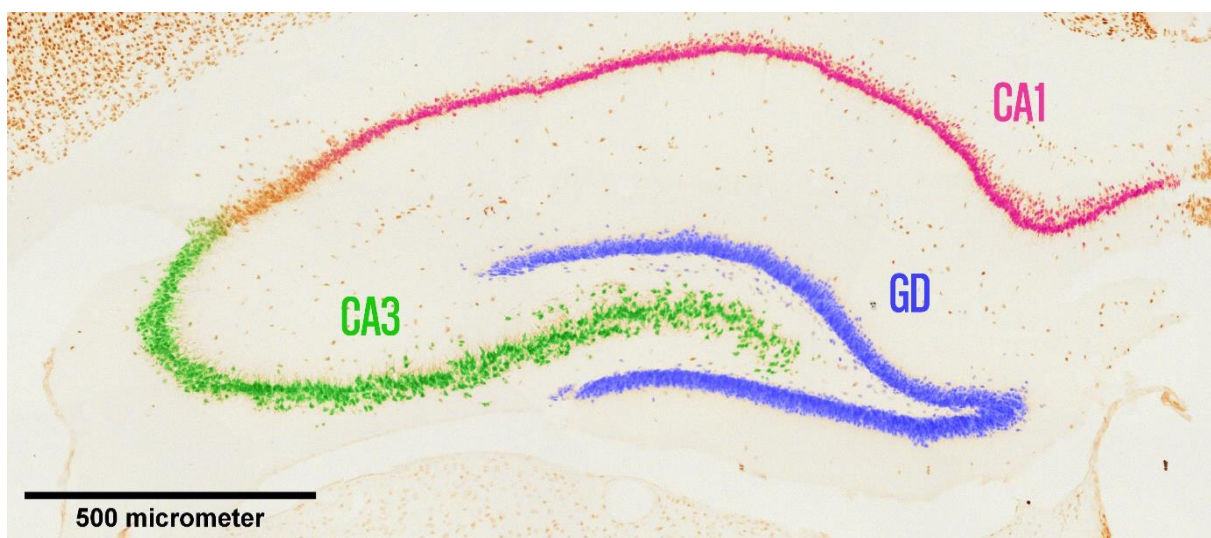


Figura 11: fotomicrografia da região do hipocampo dorsal submetido ao protocolo de imunohistoquímica para neuN. A imagem foi tratada no programa Adobe Photoshop para evidenciar as regiões analisadas. O corte corresponde aproximadamente ao bregma -3,24. Na cor rosa está marcado CA1, na cor verde, CA3 e na cor Azul o Giro Denteado.

Para densitometria óptica, o microscópio óptico (Axioplan2, Carl Zeiss), equipado com câmera digital (axioCam HRc, Zeiss), foi ajustado para obter a condição ótima de iluminação com a objetiva de aumento de 20X (NA=0,4), utilizada para captura de todas as imagens. Nesse momento, o feixe de luz foi centralizado no CCD da câmera digital e a intensidade de iluminação fixada, observando-se o histograma de brilho RGB da imagem, a fim de distribuí-lo ao longo do espectro dinâmico da câmera digital. Todos os parâmetros de iluminação do campo, abertura dos diafragmas, jogos de filtros e tempo de exposição da câmera foram controlados manualmente para evitar a variação desses parâmetros durante a sessão de captura de imagens. Em cada sessão de captura, inicialmente foram adquiridas 11 imagens de referência para calibração de densidade óptica, representativas de densidades ópticas conhecidas de entre 0,04 e 1,0, a partir de um filtro escalonado de densidade óptica neutra (Edmund Industrial Optics, #32-599). O programa ImageJ (version 1.53b, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018) foi utilizado para realizar a quantificação comparativa da densidade óptica média de uma amostragem de cada uma das regiões de interesse, onde foi obtida uma imagem em aumento de 20x (Figura 11). Para análise de cada conjunto de imagens capturadas em uma mesma sessão, inicialmente foi realizada a calibração da densidade óptica utilizando as imagens de referência

com escala crescente de níveis de cinza. Para análise semiquantitativa dos precursores neuronais e células imunorreativas para FOS, foram capturadas imagens do hipocampo dorsal da mesma forma descrita para densitometria, porém sem a captura dos filtros. Os perfis celulares imunorreativos estão foram contados nas regiões de interesse utilizado o software image J e o plugin “cell counter”. A área do hipocampo também foi obtida neste programa.

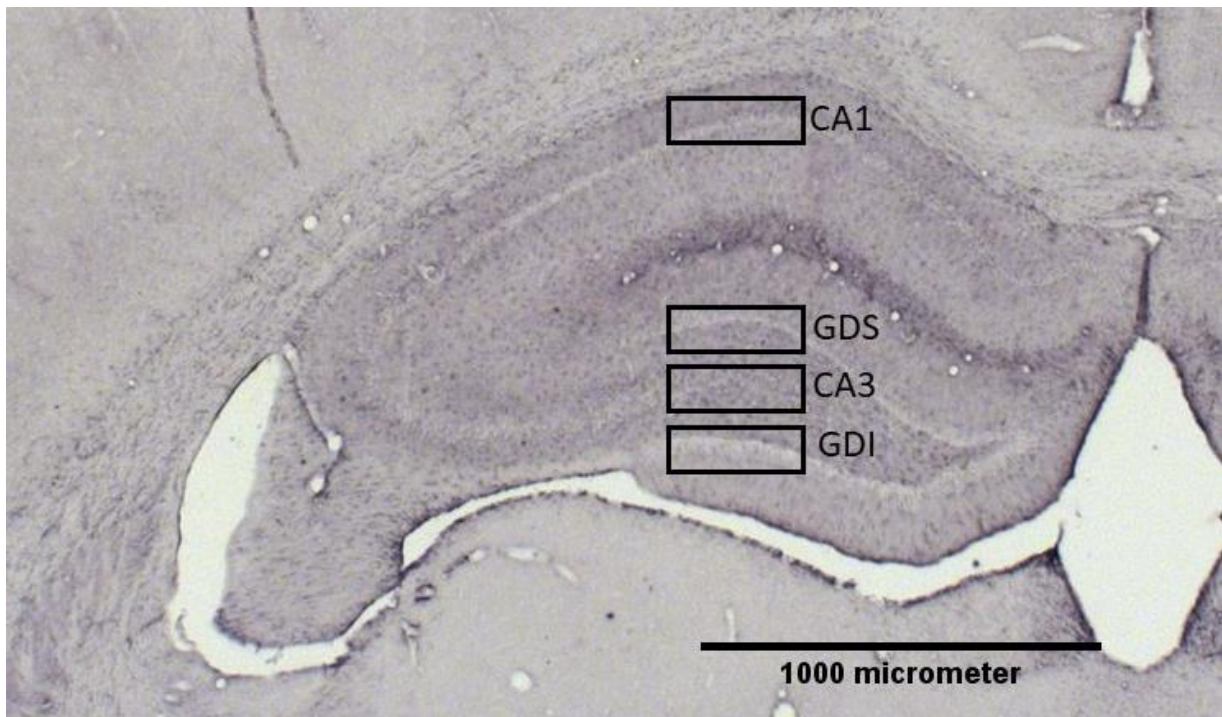


Figura 12: Fotomicrografia da região dorsal do hipocampo submetido ao protocolo de imunohistoquímica para GFAP. Na imagem, aproximadamente bregma -3,00, os retângulos correspondem a região que foi amostrada na análise de densidade média de neuN e GFAP. GDS corresponde à região superior do giro dentado e GDI corresponde à região inferior.

3.5 Análise estatística

Os resultados de todas as variáveis quantitativas foram comparados e analisados estatisticamente sempre que possível. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de outliers de rout, conservando 98% da amostra ou de Grubbs, adotando $\alpha=0,05$, e antes de qualquer análise, a distribuição normal dos dados foi verificada assim como sua homocedasticidade. Os dados que atenderam a essas duas premissas foram analisados por testes paramétricos (ANOVA para dois ou três fatores com pós-teste de Tukey ou teste t de Student), de acordo com as comparações realizadas. Os dados que não atendendo à distribuição normal foram analisados por testes não-paramétricos (teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ou teste de Mann-Whitney). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de computador GraphPad Prism version 9.00 (GraphPad Software, San Diego California USA). Em todos os casos, as diferenças estatísticas foram consideradas em nível de significância de $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Programação

As matrizes elencadas no grupo restrito receberam uma restrição alimentar de 50% em relação à média de consumo do grupo controle (figura 13).

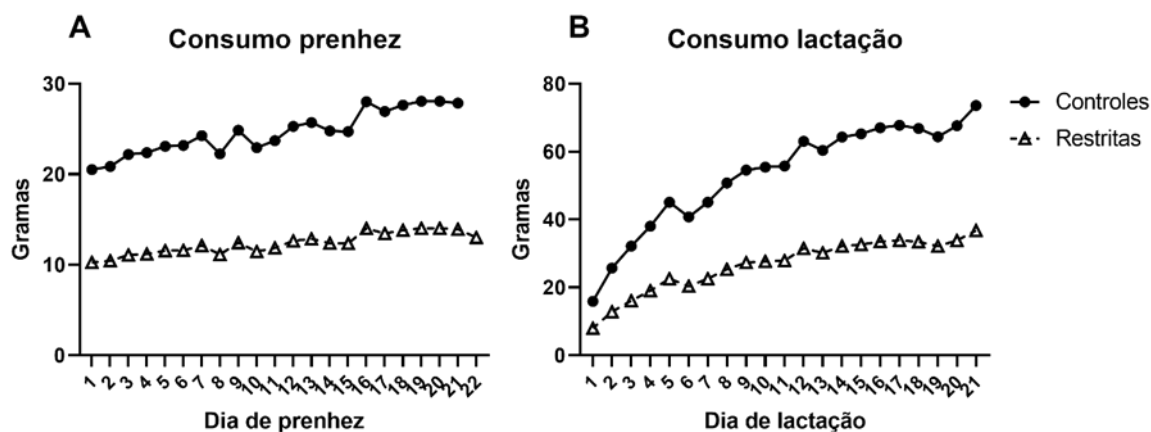


Figura 13: curva de consumo materno, grupo restrito recebendo 50% de restrição em relação ao grupo controle. Em A o período da prenhez, em B o período de lactação. A legenda em B também é válida para A.

As dietas, conforme esperados repercutiram no peso das mães durante a fase de prenhez e lactação em todos os fatores ($P < 0,0001$), sendo encontradas diferenças entre os grupos em todas as semanas avaliadas em ambos os períodos, com exceção da primeira semana de prenhez (Figura 14).

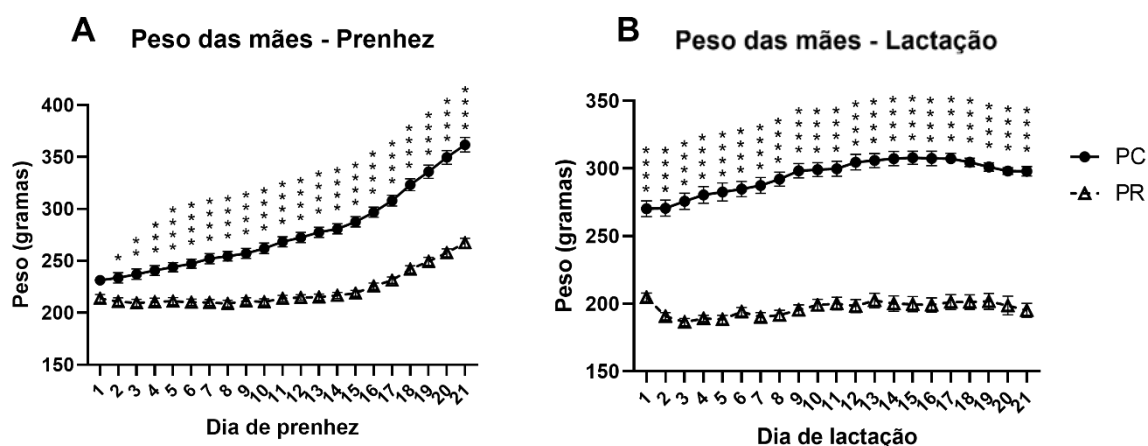


Figura 14: Peso materno. Em A o período da prenhez, em B o período de lactação. PC= Programação Controle; PR=Programação Restrita. Os asteriscos correspondem aos dados significativos * $P = 0,0184$; ** $P = 0,0026$; *** $P = 0,0005$; **** $P < 0,0001$.

4.2 Preferência Alimentar e Preferência à Sacarose

O Coeficiente de preferência alimentar e preferência à sacarose atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade e foram analisadas por ANOVA com medidas repetidas.

Os dados de consumo bruto de ambas as dietas em todos os animais foram analisados por ANOVA de 3 vias.

A partir dos dados obtidos de Coeficiente de preferência, observamos que a programação gerou efeito estatisticamente significativo em relação à preferência à dieta hiperglicídica no intervalo de 12 horas de consumo ($P=0,0208$), mas não gerou efeito em nenhum outro intervalo avaliado e em nenhuma das demais dietas (figura 15).

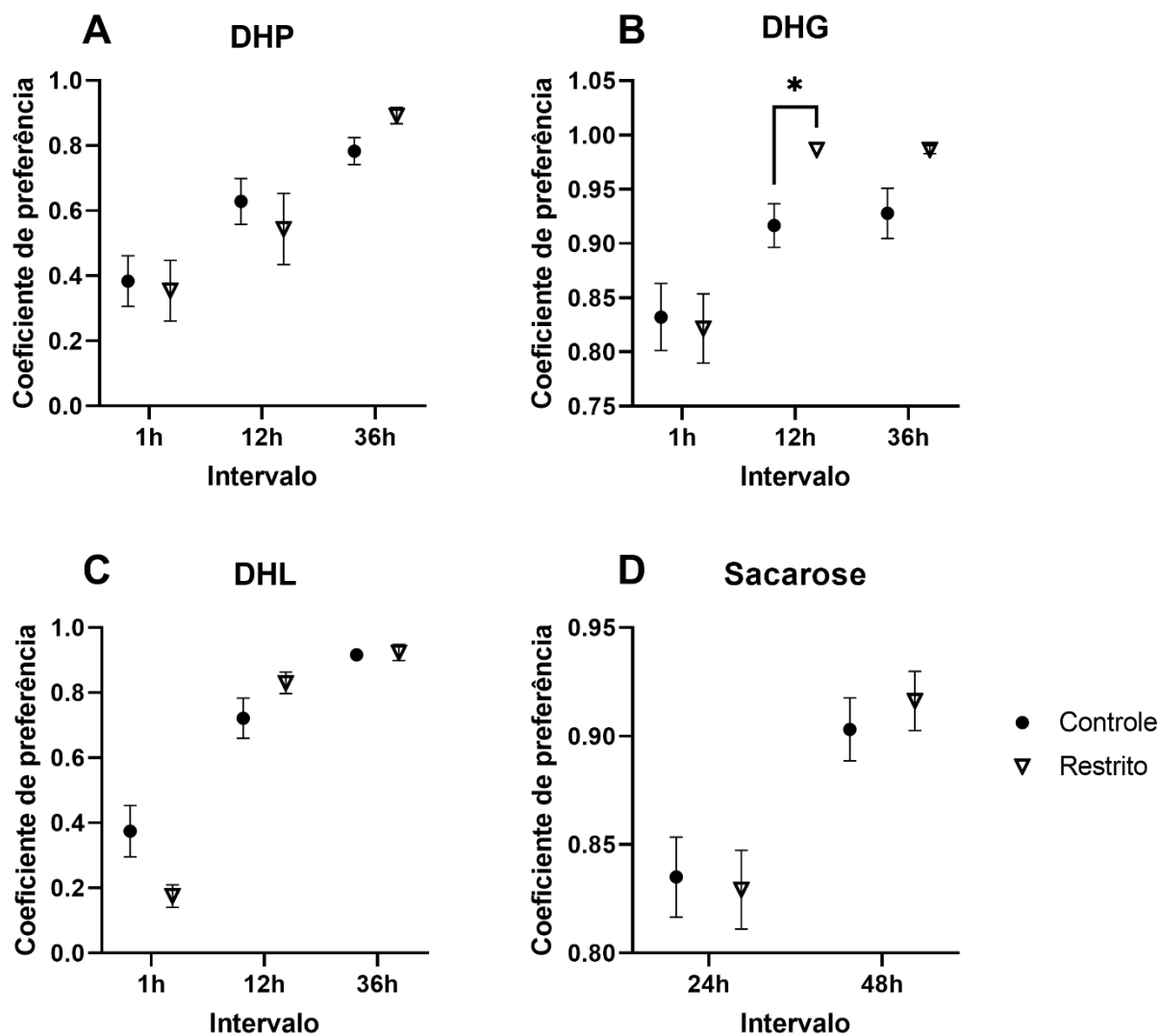


Figura 15: Gráficos ilustrando a comparação entre os grupos programação controle e programação restrita em relação ao Coeficiente de preferência da ração enriquecida (média e erro típico da média). Em A, dieta hiperproteica. Em B, dieta hiperglicídica. Em C, dieta hiperlipídica. Em D, preferência à sacarose. A legenda em D é válida para todos os gráficos. As chaves indicam as diferenças significativas, * $P=0,0208$.

A partir dos dados obtidos do consumo bruto, identificamos que para todas as dietas enriquecidas houve um efeito significativo de aumento do consumo em relação à dieta padrão ao longo do tempo. Este feito produziu diferenças em diferentes momentos para cada tipo de dieta enriquecida (Figura 16).

Na dieta hiperproteica não houve diferença estatisticamente significativa quanto à programação ($P = 0,453$), no entanto, houve efeito significativo em relação à dieta ($P < 0,0001$), onde o grupo Programação controle, apresentou um consumo maior da dieta enriquecida em relação à dieta padrão no intervalo de 12 horas ($P = 0,0448$) e 36 horas ($P < 0,0001$), enquanto no grupo restrito houve maior consumo da dieta enriquecida no intervalo de 36 horas ($P < 0,0001$). Na primeira hora do experimento, ambos os grupos consumiram significativa maior quantidade da dieta padrão.

A dieta hiperglicídica apresentou interação estatisticamente significativa entre programação e dieta ($P < 0,0001$), além de ter apresentado significância para ambos os fatores isoladamente, dieta e programação ($P < 0,0001$). A dieta enriquecida foi mais consumida em relação à dieta normal no grupo programação controle nos intervalos de 1h ($P = 0,0045$), 12h ($P < 0,0001$) e 36h ($P < 0,0001$), assim como no grupo programação restrita, em que a DHP foi significativamente mais consumida no intervalo de 1h ($P = 0,0062$), 12 e 36h ($P < 0,0001$ para ambos).

Em relação à dieta hiperlipídica houve efeito estatisticamente significativo tanto em relação à programação, quanto em relação à dieta ($P < 0,0001$), mas não houve significância quanto a interação entre os fatores. A DHL foi mais consumida pelo grupo programação controle no intervalos de 12h ($P = 0,0013$) e 36h ($P < 0,0001$). No grupo programação restrita houve maior consumo da dieta enriquecida em todos os intervalos avaliados ($P < 0,0001$).

Na análise do consumo de sacarose, não houve interação entre a programação e a dieta, porém, a dieta de forma isolada foi significativa ($P < 0,0001$), assim como a programação ($P = 0,0176$). A sacarose foi mais consumida em relação à água em ambos os grupos em todos os intervalos avaliados ($P < 0,0001$).

Os animais pertencentes ao grupo restrito apresentaram pesos corporais menores do que os animais do grupo controle ($P < 0,0001$) aos 30 dias de vida, mas não apresentaram nenhuma diferença em relação ao índice de eficiência alimentar (ganho de peso/consumo) e conversão alimentar (consumo/ganho de peso) (Figura 17), o que está de acordo com o fato de que de forma geral, os animais do grupo Programação Restrita consumiram menos alimentos do que os animais do grupo controle (Figura 16).

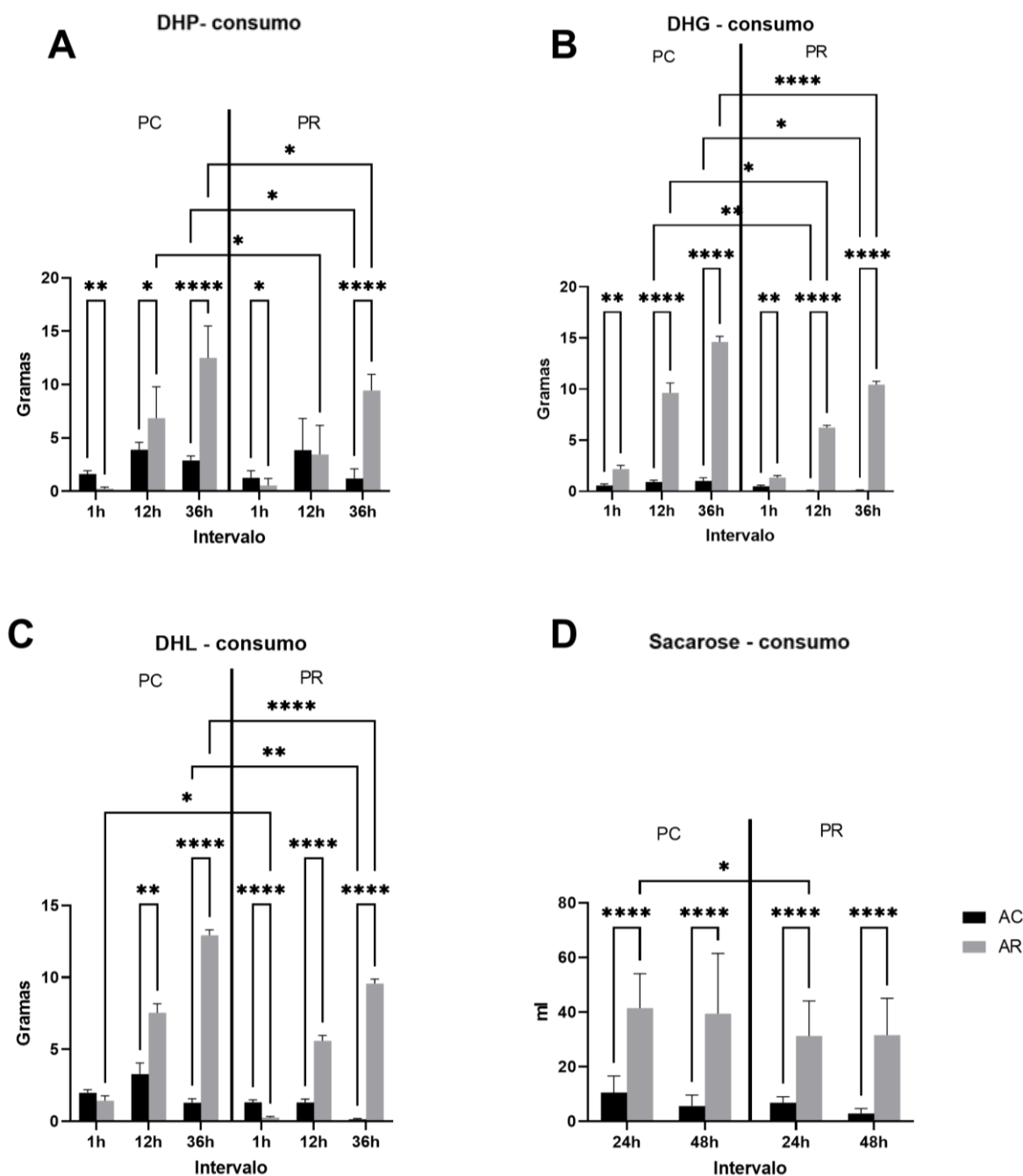


Figura 16: Gráficos ilustrando a diferença de consumo alimentar da ração enriquecida (RE) em relação à ração padrão (RP) no grupo programação controle e no grupo programação restrita, conforme os intervalos de tempo estudados (média e erro típico da média). Todos os dados foram avaliados por 3way ANOVA. Em A, dieta hiperproteica. Em B, dieta hiperglicídica. Em C, dieta hiperlipídica. Em D, preferência à sacarose. As chaves correspondem a diferenças significativas entre os grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$, **** $P < 0,0001$. A legenda em D é válida para todos os gráficos.

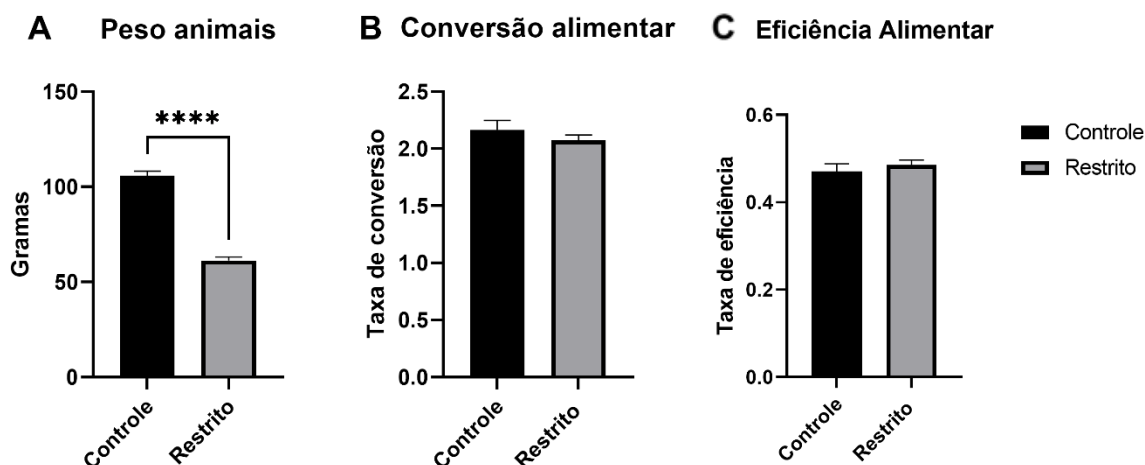


Figura 17: Gráficos ilustrando os dados de peso, conversão alimentar e eficiência alimentar no grupo programação controle e no grupo programação restrita aos 30 dias de idade (média e erro típico da média). Todos os dados foram avaliados por teste T. Em A, peso corporal. Em B, conversão alimentar. Em C, eficiência alimentar. A chave corresponde a diferença significativa entre os grupos. ****P<0,0001. A legenda em C é válida para todos os gráficos.

4.3 Dados Biométricos

Os dados de peso, consumo, índice de eficiência alimentar e conversão alimentar dos animais em sua fase ad libitum (semanas 4 a 8) atenderam aos critérios de normalidade e foram analisados por ANOVA com medida repetida.

Na análise da Índice de Eficiência Alimentar houve interação significativa entre o tempo em semanas e a Programação ($P=0,0062$). O tempo isoladamente apresentou efeito estatisticamente significativo ($P<0,0001$), embora a programação não tenha apresentado ($P=0,4244$). Não houve diferença entre os grupos.

No Índice de conversão alimentar não houve interação entre o tempo e a programação ($P=0,0532$) e tampouco na programação isoladamente ($P=0,1305$). O tempo, por sua vez, foi significativo ($P<0,0001$). Não houve diferença entre os grupos (Figura 18).

Os dados de peso foram significantes em relação ao tempo, à programação e à interação entre os fatores ($P<0,0001$), e foram encontradas diferenças entre os grupos em todas as semanas avaliadas ($P<0,0001$). Em relação ao consumo, houve significância da programação e do tempo ($P<0,0001$) e também da interação entre os fatores ($P=0,0002$). Foram detectadas diferenças entre os grupos em todas as semanas.

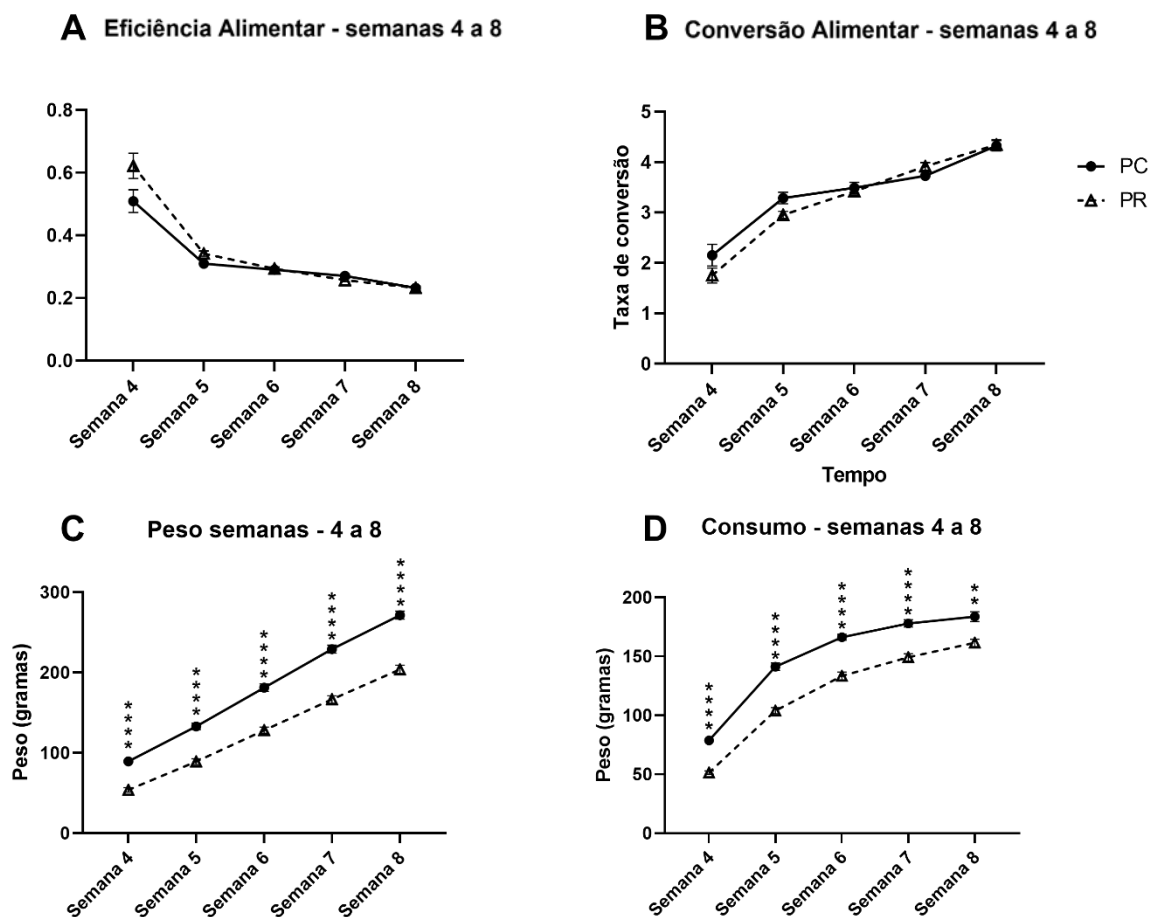


Figura 18: Gráficos ilustrando resultados biométricos. Em A: índice de Eficiência alimentar (ganho de peso/consumo). Em B: índice de conversão alimentar (consumo/ganho de peso). Em C os dados de peso dos aniamais no período e em D o consumo. Os asteriscos em C e D representam a diferença significativa encontrada entre os grupos ****P= <0,0001 e **P=0,0018. A legenda em B é válida para todos os gráficos, e nela PC corresponde à Programação Controle e PR corresponde à Programação Restrita.

Todos os demais dados biométricos avaliados atenderam aos critérios de distribuição normal e homocedasticidade e foram analisados por ANOVA 2 fatores.

No peso semanal dos animais durante a fase de aplicação da dieta na fase adulta, o grupo, o tempo, o peso e a interação entre grupo e tempo foram estatisticamente significantes ($P < 0,0001$). Na semana de vida 9, PR-AC e PR-AR foram diferentes de PC-AC ($P < 0,0001$), e PC-AR foi diferente de PR-AC e PR-AR ($P < 0,0001$). Na semana 10 foram vistas diferenças entres todos os grupos. Nas semanas 11, 12, 13 e 14 somente PC-AR e PR-AC não apresentaram diferença ($P = 0,1428$), enquanto as demais comparações foram significativas ($P < 0,0001$) (figura 19).

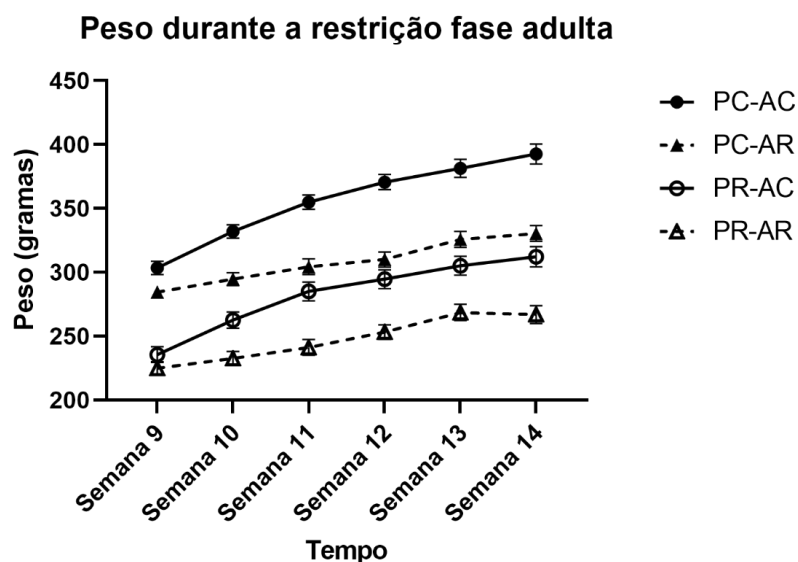


Figura 19: Gráfico ilustrando a variação de peso entre os grupos durante a realização da restrição alimentar na fase adulta. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

Nos dados de glicemia (Figura 20 A), não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,2828$). A alimentação da fase adulta isoladamente também não produziu efeito significativo ($P = 0,0863$), embora a restrição aplicada como forma de programação tenha produzido aumento significativo na glicemia ($P = 0,0045$). O grupo PR-AC ($78,00 \pm 4,73$) foi diferente de PC-AC ($P = 0,0295$, $62,71 \pm 1,43$), e PR-AC foi diferente de PC-AR ($P = 0,0082$, $67,294 \pm 4,54$).

Em relação ao peso do animal no dia da eutanásia (Figura 20 B), não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,2236$). No entanto, a restrição produziu redução significativa do peso tanto para programação ($P < 0,0001$) como para alimentação ($P < 0,0001$). O peso dos animais que receberam restrição em alguma fase da vida foram significativamente menores do que o peso dos animais do grupo PC-AC ($395,09 \pm 6,55$), sendo PC-AR ($P < 0,0001$, $321,6 \pm 7,46$), PR-AC ($P < 0,0001$, $317,65 \pm 8,48$) e PR-AR ($P < 0,0001$, $262,82 \pm 7,11$). Somente PC-AR não foi diferente de PR-AC nesta análise ($P = 0,9828$).

Em termos de tamanho do animal (distância naso-anal, Figura 20 C), também não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,8397$), embora haja significância para a programação ($P < 0,0001$) e para a alimentação ($P < 0,0001$). Nesta análise, os animais apresentaram uma escala decrescente com diferença estatisticamente significativa entre todas as comparações possíveis, sendo que os grupos que fizeram restrição em alguma fase apresentaram tamanhos menores do que PC-AC ($22,82 \pm 0,16$), sendo PC-AR ($P = 0,0094$, $21,92 \pm 0,21$), PR-AC ($P < 0,0001$, $21,12 \pm 0,2$) e PR-AR (P

<0,0001, $20,16 \pm 0,157$). PC-AR e PR-AC também foram estatisticamente diferentes entre si ($P = 0,0157$), assim como PC-AR e PR-AR ($P < 0,0001$) e PR-AC e PR-AR ($P = 0,0014$).

Nos dados referentes ao peso do encéfalo (Figura 20 D), não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,3731$), embora a programação ($P < 0,0001$) e a alimentação ($P = 0,0461$) tenha sido significantes. Os dois grupos programados (PR) apresentaram encéfalos menores do que os grupos que não sofreram programação (PC) ($P < 0,0001$), sendo que não houve diferença entre os grupos com um mesmo tipo de programação (PC-AC = $1,991 \pm 0,02$; PC-AR = $1,916 \pm 0,025$; PR-AC = $1,734 \pm 0,026$; PR-AR = $1,704 \pm 0,030$).

Em relação ao coeficiente de encefalização (peso do encéfalo/peso do corpo * 100), houve significância da programação e da alimentação ($P < 0,0001$), porém não houve interação entre os fatores (Figura 20 E). Todos os grupos apresentaram diferenças entre si (PC-AC = $0,505 \pm 0,007$; PC-AR = $0,599 \pm 0,013$; PR-AC = $0,550 \pm 0,011$; PR-AR = $0,653 \pm 0,013$).

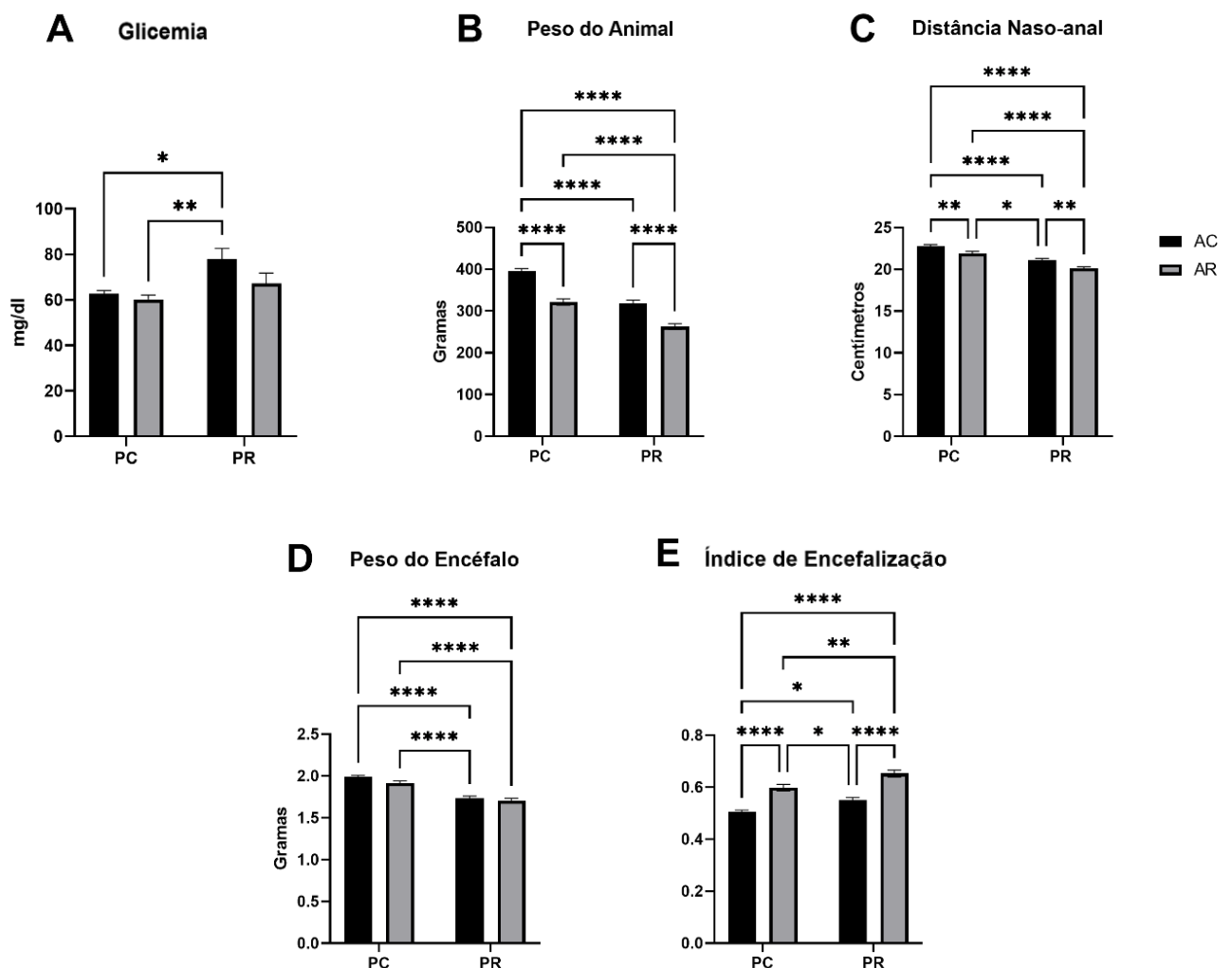


Figura 20: Gráficos ilustrando dados biométricos – glicemia, peso do animal, distância naso-anal, peso do encéfalo e coeficiente de encefalização (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). Em A, glicemia do animal (mg/dl), Em B, Peso do animal (gramas). Em C, distância naso-anal (cm). Em D, peso do encéfalo (g) e em E, coeficiente de encefalização. Em D, glicemia (mg/dl). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$,

**** $P < 0,001$. A legenda em B é válida para A, C e D. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

Para a gordura visceral (Figura 21 A) houve efeito significativo de programação ($P < 0,0001$) e da alimentação na fase adulta ($P < 0,0001$), em que ambas promoveram uma redução do peso desta gordura. Também houve interação significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,0276$). PC-AC foi o grupo que apresentou maior peso de gordura visceral ($10,37 \pm 0,41$). PC-AR foi estatisticamente diferente de PC-AC ($P < 0,0001$, $7,49 \pm 0,29$), assim como PR-AC ($P < 0,0001$, $7,52 \pm 0,36$) e PR-AR ($P < 0,0001$, $6,42 \pm 0,36$). PC-AR não foi diferente de PR-AC ($P = 0,9999$), mas diferiu de PR-AR ($P = 0,0221$). PR-AC e PR-AR também diferiram ($P = 0,0118$).

Em relação a gordura retroperitoneal (Figura 21 B), não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,1186$). No entanto, a programação isoladamente foi significativa ($P < 0,0001$), assim como a alimentação ($P < 0,0001$). Os grupos PC-AR ($P = 0,0006$, $7,20 \pm 0,48$), PR-AC ($P < 0,0001$, $5,53 \pm 0,46$) e PR-AR ($P < 0,0001$, $4,15 \pm 0,28$) foram significativamente menores do que o grupo PC-AC ($10,05 \pm 0,62$). PC-AR e PR-AR também foram diferentes ($P = 0,0001$).

Na comparação do peso da gordura periepídídima (Figura 21 C), houve efeito da programação ($P < 0,0001$) e da alimentação ($P < 0,0001$) que produziram redução deste tecido, pois houve interação significativa entre os fatores ($P = 0,0230$). Todos os grupos apresentaram redução de gorduras em relação ao grupo PC-AC ($9,42 \pm 0,44$). PC-AR ($P < 0,0001$, $6,71 \pm 0,32$), PR-AC ($P < 0,0001$, $5,91 \pm 0,34$) e PR-AR ($P < 0,0001$, $4,76 \pm 0,23$). PC-AR e PR-AR também foram estatisticamente diferentes entre si ($P = 0,0006$).

No Coeficiente de adiposidade (soma do peso das gorduras/peso do animal) a programação foi significativa ($P < 0,0001$), embora a alimentação não tenha sido e os fatores não tenham apresentado interação (Figura 21 D). Houve diferença entre PR-AC e PC-AC ($P = 0,0004$) e entre PR-AR e PC-AC ($P = 0,0002$).

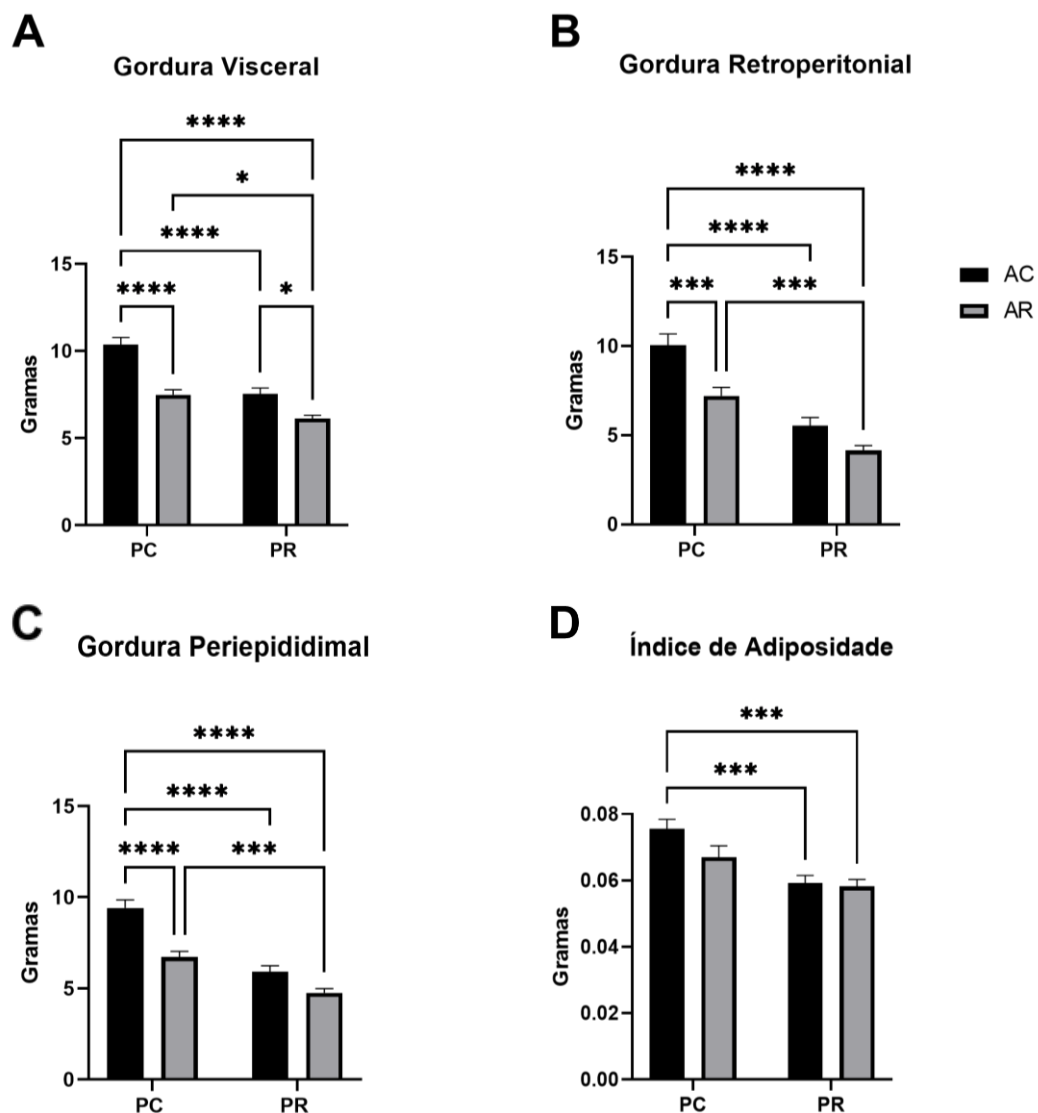


Figura 21: Gráficos ilustrando dados biométricos - gorduras (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). A: gordura visceral. B: gordura retroperitoneal. C: gordura periepididimal. D: coeficiente de adiposidade. As chaves correspondem a diferenças significativas entre os grupos. A legenda em B também é válida para A, C e D. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

Os dados obtidos na análise da razão isotópica de nitrogênio 15 foram significativos em relação à alimentação ($P=0,0147$), mas não em relação à programação ($P=0,0759$) e tampouco na interação entre os fatores programação e alimentação ($P=0,0815$). Foram detectadas diferenças entre PC-AR ($3,554 \pm 0,121$) e PC-AC ($P=0,0194$; $3,889 \pm 0,039$), e entre PR-AC ($3,892 \pm 0,043$) e PC-AR ($P=0,0182$) (figura 22).

A razão isotópica de carbono 13 apresentou significância sobre a programação ($P=0,0030$) e a alimentação ($P=0,0151$), embora não tenha sido detectada diferença quanto à interação entre os fatores. PR-AC ($-19,746 \pm 0,032$) foi diferente de PC-AR ($P=0,0016$; $-19,749 \pm 0,032$), sendo que PC-AR também foi diferente de PR-AR ($P=0,0245$; $-19,706 \pm 0,025$).

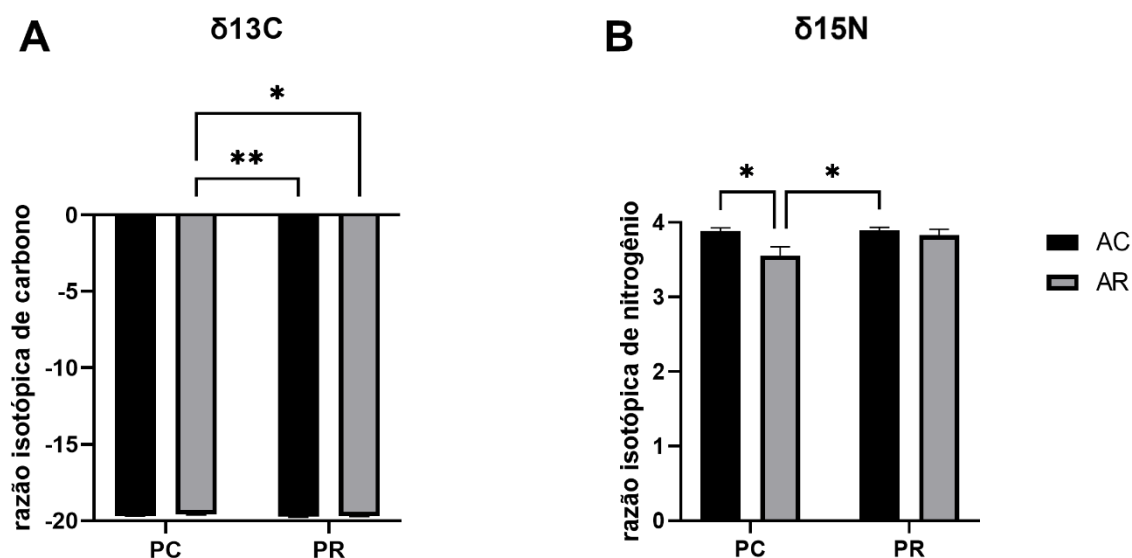


Figura 22: Gráficos ilustrando as razões isotópicas (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). A: Razão isotópica de carbono. B: razão isotópica de nitrogênio. As chaves correspondem a diferenças significativas entre os grupos. A legenda em B é válida para A. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

4.4 Testes comportamentais

4.4.1 Campo Aberto

Na avaliação do campo aberto, os dados que atenderam aos critérios de normalidade foram avaliados por ANOVA com dois fatores (Figura 23). Em relação aos levantares, não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,30$). No entanto, a restrição produziu diminuição significativa nos levantares tanto quando aplicada como programação ($P = 0,0078$) e também quando aplicada na fase adulta ($P = 0,0335$). Os grupos PR-AC ($P = 0,045$; $12,6 \pm 1,25$) e PR-AR ($P = 0,005$; $10,4 \pm 0,8$), apresentaram menos levantares do que PC-AC ($16,7 \pm 1,62$).

Nos dados de imobilidade foi encontrada diferença significativa somente em relação à programação ($P = 0,0140$), porém não houve detecção de diferença entre os grupos quando avaliados todos os grupos por ANOVA. Assim, os animais foram agrupados com base somente na programação e avaliados por teste T, onde houve diferença entre PC e PR.

Os dados de autolimpeza não atenderam à distribuição normal e foram avaliados por Kruskal-wallis, onde foi detectada significância de efeito. A partir disso, os grupos foram alocados somente com relação à programação e avaliados por mann whitney, onde houve diferença entre os dois grupos ($P = 0,0286$).

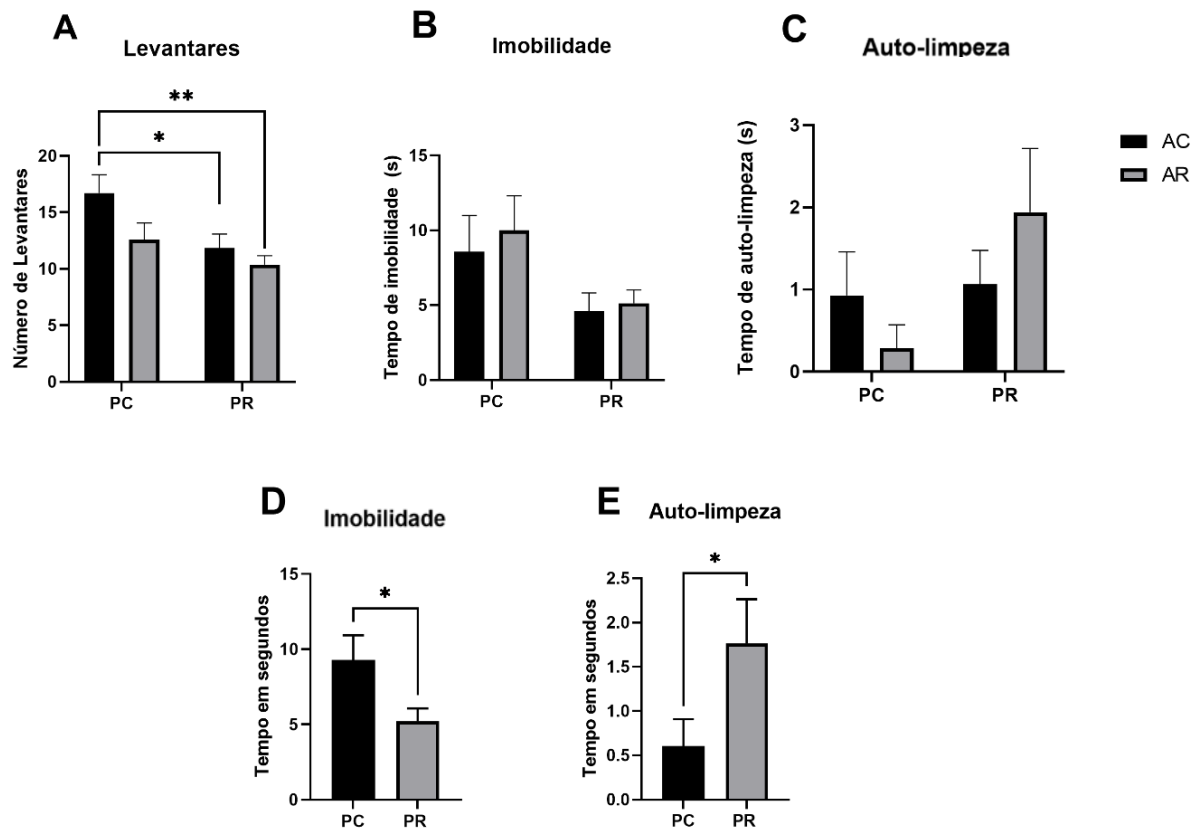
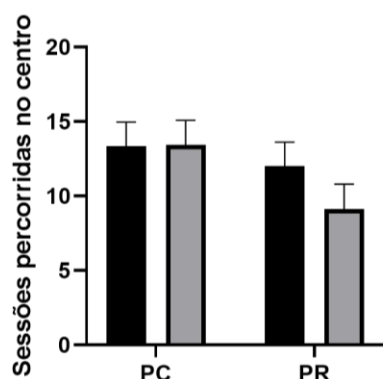


Figura 23: Gráficos de levantares, imobilidade e auto-limpeza para os resultados do teste de campo aberto (média e erro típico da média). A: Número de levantares (ANOVA 2 fatores). B: Tempo de imobilidade (ANOVA 2 fatores). C: Tempo de auto-limpeza (Kruskal-Wallis). D: Tempo de Imobilidade (teste T). E: tempo de autolimpeza (teste T). As chaves correspondem a diferenças significativas entre os grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. A legenda em C é válida para todos os gráficos. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

Os resultados da deambulação no centro da arena (Figura 24) foram avaliados por ANOVA com dois fatores e não apresentaram nenhum tipo de significância na programação ($P = 0,0938$), alimentação ($P = 0,4016$) e interação entre os fatores ($P = 0,3783$).

Os resultados da deambulação na periferia (Figura 24) também foram avaliados por ANOVA com dois fatores. Não houve interação significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,9255$) e a alimentação isoladamente também não produziu efeito significativo ($P = 0,1484$), enquanto a programação isoladamente ($P < 0,0001$), produziu aumento significativo de deambulação na periferia. O grupo PC-AR ($57 \pm 3,126$) apresentou menos deambulação na periferia do que os grupos PR-AC ($P = 0,0028$, $81,59 \pm 5,66$) e PR-AR ($P = 0,0422$, $75,12 \pm 4,48$), respectivamente, enquanto PR-AC também foi diferente de PC-AC ($P = 0,0270$; $64,357 \pm 4,624$). Todos os grupos avaliados preferiram deambular na periferia ($P < 0,0001$).

A Deambulação Centro



B Deambulação Periferia

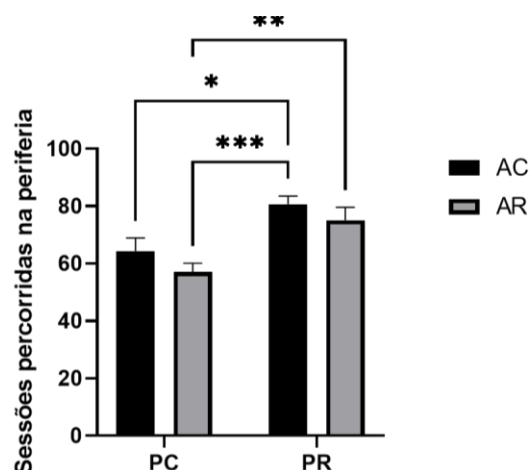


Figura 24: Gráficos de deambulação para os resultados do teste de campo aberto (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). A: Sessões percorridas no centro. B: Sessões percorridas na periferia. As chaves correspondem a diferenças significativas entre os grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. A legenda em B é válida para A. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita – Alimentação Restrita.

4.4.2 Labirinto em Cruz Elevado

Todos os dados obtidos no Labirinto em Cruz Elevado apresentaram distribuição normal e foram analisados por ANOVA para dois fatores (Figura 24).

Na análise de dados de tempo de permanência no braço aberto, não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P=0,3425$), e tampouco a programação ($P=0,1853$) ou a alimentação isoladamente ($P=0,2309$) apresentaram significância.

As ausências de interação assim como a ausência de efeitos isolados dos fatores de programação e alimentação também foram observadas para o tempo de permanência no braço fechado (interação: $P = 0,2561$; Programação: $P = 0,2940$; Alimentação: $P = 0,1815$), o número de entradas no braço fechado (interação: $P = 0,9889$; Programação: $P = 0,7272$; Alimentação: $P = 0,4861$), o número de entradas no braço aberto (interação: $P = 0,1768$; Programação: $P = 0,1319$; Alimentação: $P = 0,1768$) e a quantidade de Head Dips (interação: $P = 0,2045$; Programação: $P = 0,1894$; Alimentação: $P = 0,1158$).

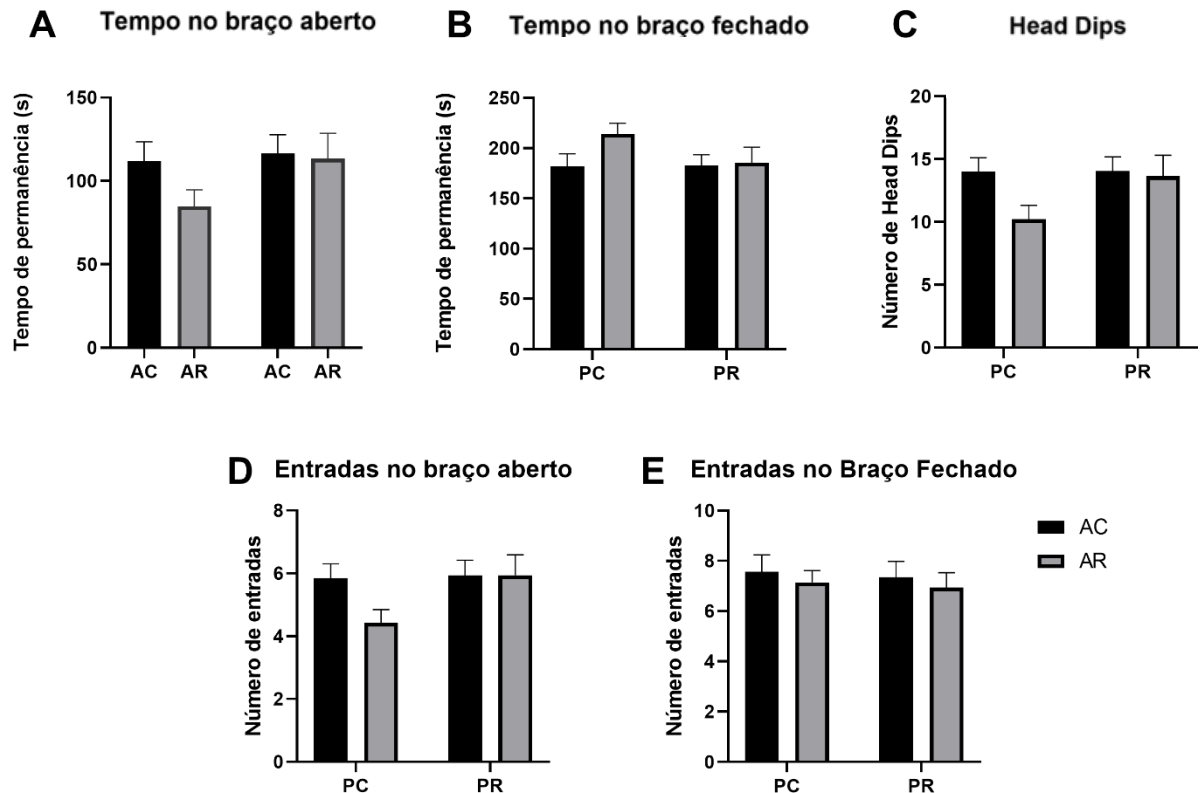


Figura 25: Gráficos ilustrando os resultados obtidos no Labirinto em Cruz Elevado (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). A: Tempo de permanência no braço aberto. B: tempo de permanência no braço fechado. C: Head Dips. D: Número de entradas no braço aberto. E: número de entradas no braço fechado. A legenda em E é válida para A, B, C e D. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

4.4.3 Reconhecimento de Novo Objeto e Localização de Objeto

Os dados de coeficiente de exploração calculado a partir dos resultados obtidos no teste de Reconhecimento de Novo Objeto e Localização de Objeto atenderam aos critérios de distribuição normal e foram avaliados por ANOVA de 2 fatores (Figura 26).

Houve interação estatisticamente significativa entre Programação e Alimentação na fase adulta no teste NORT sessão 2 – Teste 50 min, quando avaliado o coeficiente de exploração baseado na frequência de interação com o objeto ($P= 0,0441$). Não foi detectada nenhuma diferença entre os grupos ou em relação aos fatores em nenhuma outra sessão, seja de tempo de interação ou de frequência.

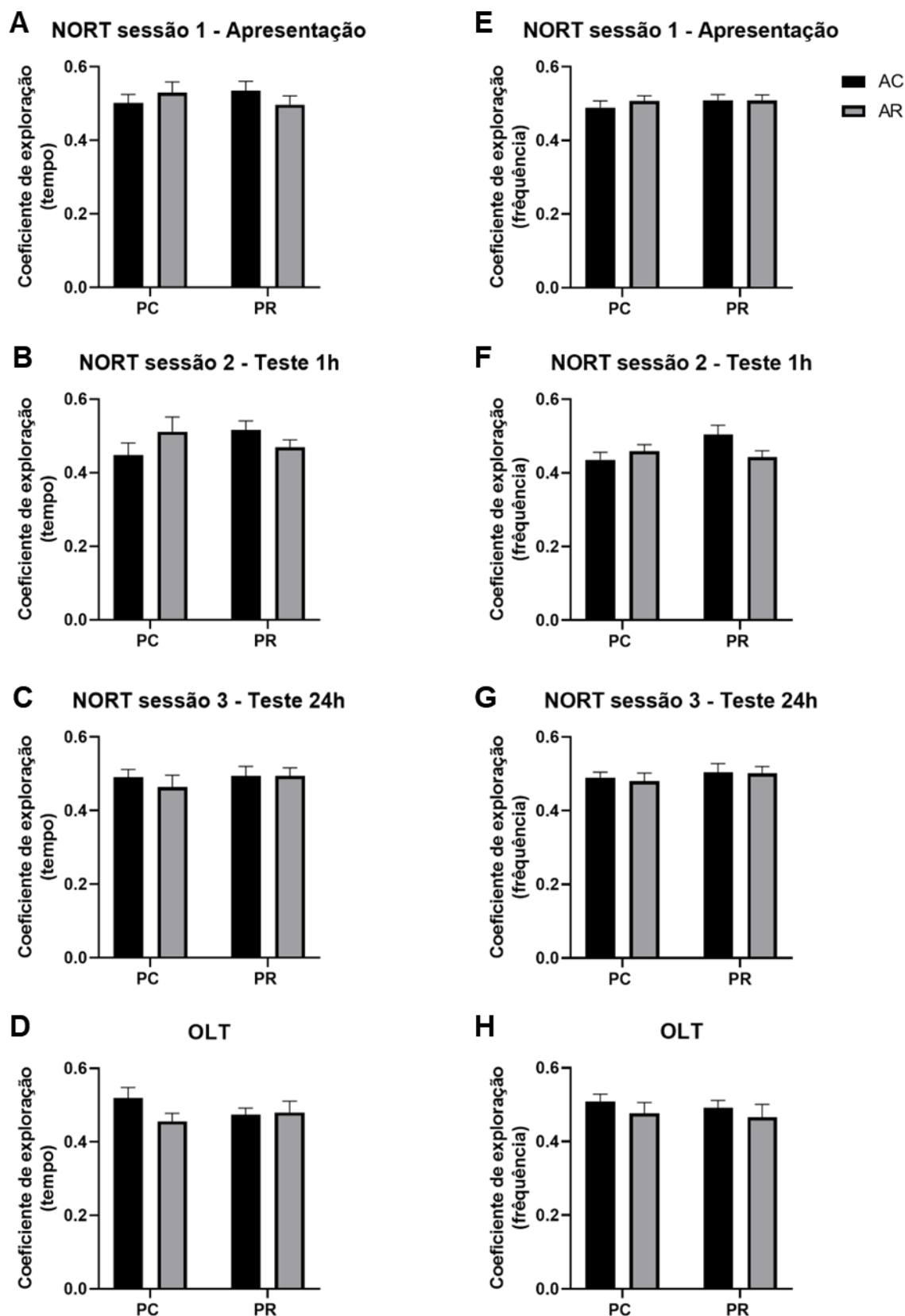


Figura 26: gráficos ilustrando os resultados da comparação do coeficiente de exploração nos testes NORT e OLT. Em A, B, C e D: coeficiente calculado a partir do tempo de interação com os objetos. Em E, F, G e H, coeficiente calculado a partir da frequência de interação com os objetos. A legenda em E é válida para todos os gráficos. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

4.4.4 Labirinto de Barnes

O percentual de uso das estratégias de busca da caixa de escape no Labirinto de Barnes foi atribuído ao longo da fase de treino e no dia do teste de retenção. A estratégia de busca mais utilizada na fase de treinos foi a seriada, seguida pela direta, enquanto a aleatória foi pouco usual (Figura 27). Na fase de aquisição (treinos) houve diferença na adoção da estratégia direta com relação à programação, onde os animais programados fizeram mais uso da estratégia de busca direta do que os animais não programados.

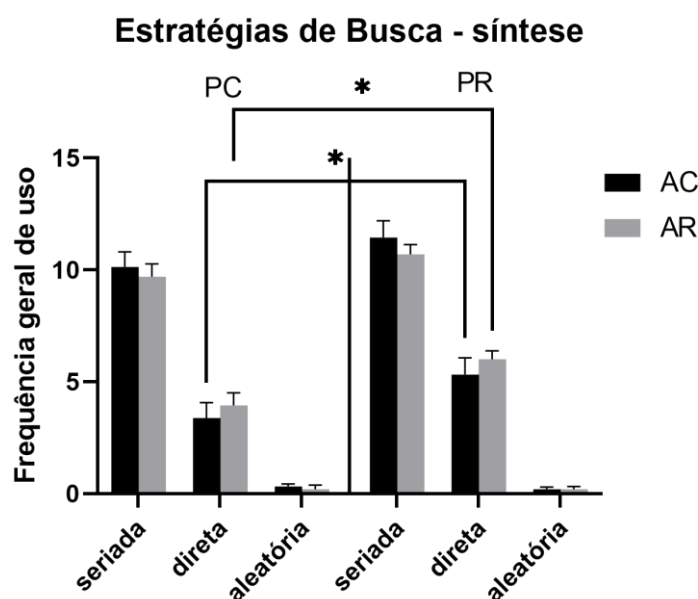


Figura 27: gráfico demonstrando o percentual médio de ocorrência de estratégias de busca entre os grupos. As chaves indicam as diferenças significativa. * $P < 0,05$. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

Quando os grupos são comparados pela utilização de estratégia para cada dia da fase de aquisição, é observado efeito de treino na adoção de estratégia de busca seriada ($P = 0,0066$) e estratégia direta ($P = 0,0027$), mas não na aleatória ($P = 0,0602$). Similarmente, houve efeito significativo da programação em relação à busca seriada ($P = 0,0287$) e à direta ($P = 0,0182$), mas não na aleatória ($P = 0,7034$). A estratégia direta não foi diferente entre os grupos nos dias 1, 3 e 5, porém, o grupo PR-AR a adotou mais do que os grupos não programados no dia 2 ($P < 0,01$) e mais do que o grupo controle, PC-AC, no dia 4 ($P < 0,001$). Já a estratégia seriada foi menos adotado por PR-AR em relação à PC-AC no dia 2 ($P = 0,0437$). Na avaliação do teste de retenção, por outro lado, o grupo PR-AC foi o que mais utilizou a estratégia seriada, seguido por PR-AR, enquanto PC-AR, por sua vez, fez maior uso da estratégia direta nesta fase, em contraste com a análise de emprego de estratégias na fase de aquisição (Figura 28).

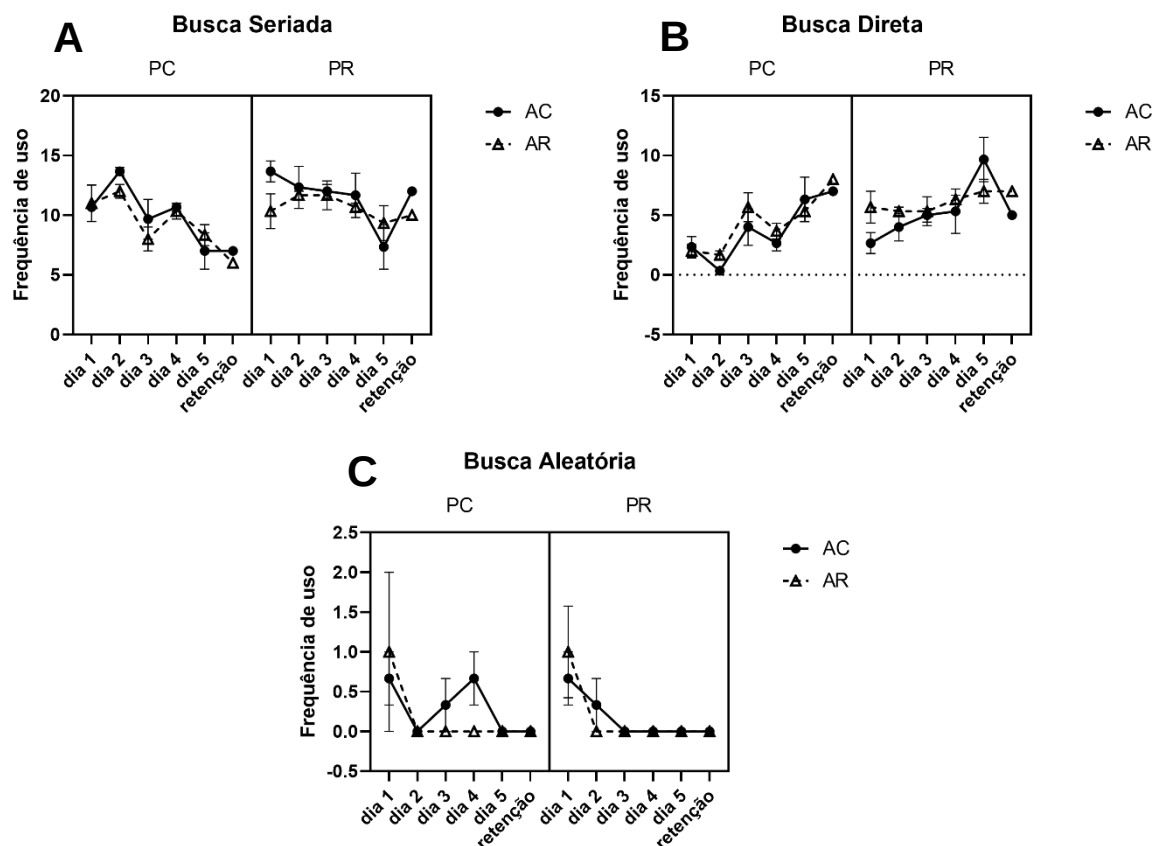


Figura 28: gráficos demonstrando o percentual de ocorrência de estratégias de busca entre os grupos separado nos 5 dias de treino e o dia do teste de retenção. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita – Alimentação Restrita.

Em relação à latência de nose-poke no teste de retenção, os dados atenderam aos critérios de normalidade e foram analisados por anova para dois fatores, onde foi encontrado efeito significativo da programação ($P=0,0150$), mas não foram detectados outros efeitos. A latência de entrada nesta fase também apresentou significância estatística quanto programação ($P=0,0068$). Na análise de latência de nose-poke, referente ao período de aquisição, analisada por anova com medida repetida, houve efeito estatisticamente significativo aos treinos ($P<0,0001$), onde os animais diminuíram o tempo necessário para encontrar a toca ao longo do tempo. A latência para entrada na toca não apresentou significância estatística com relação à interação dos fatores programação e alimentação na fase adulta ($P= 0,4218$), mas apresentou efeito da alimentação ($P= 0,0062$) e da programação ($P= 0,0168$) isoladamente (Figura 29).

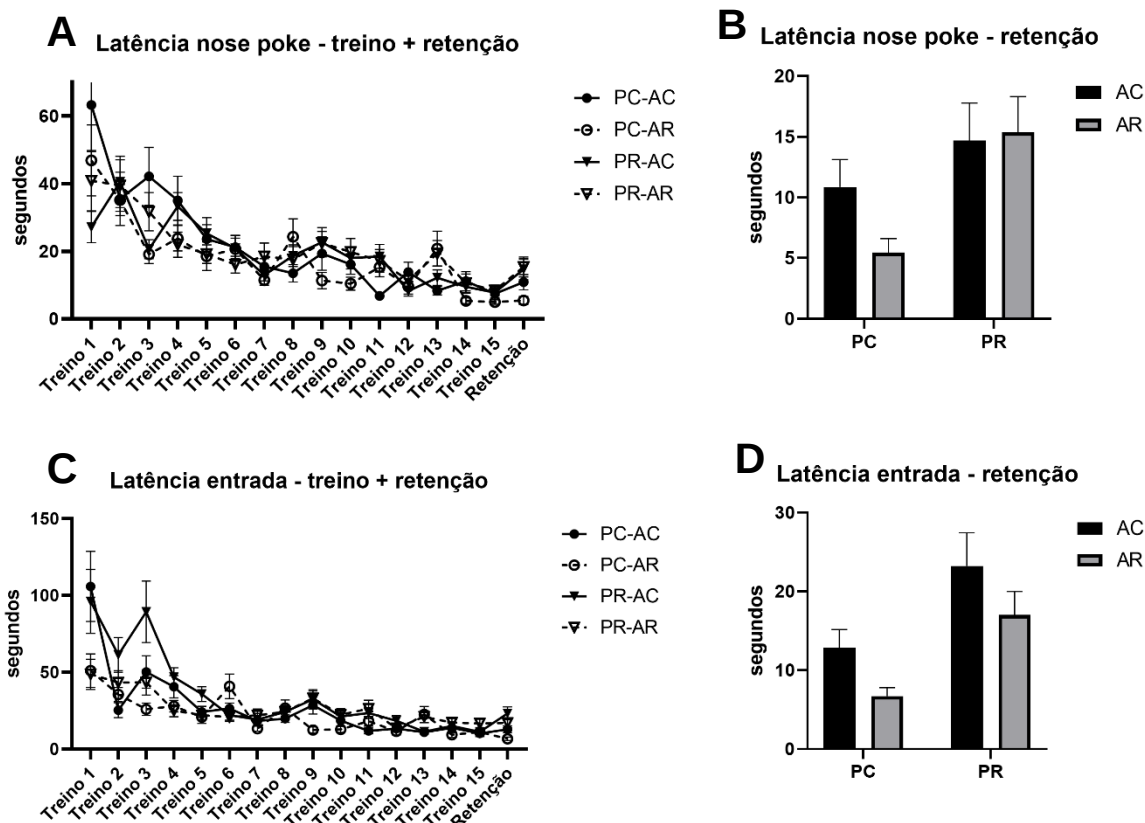


Figura 29: gráficos ilustrando os resultados de latência do labirinto de Barnes. Em A e B encontram-se os dados referentes ao período de treinos. Em C e D estão os dados do dia do teste de retenção de memória. A legenda em A é válida para A e B e a legenda em C é válida para C e D. Não houve diferença entre os grupos. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita – Alimentação Restrita.

Nas análises da distância percorrida pelo animal referente aos treinos não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores. Porém, o fator Programação foi significativo ($P= 0,0386$), assim como a alimentação ($P= 0,0247$) e os treinos ($P<0,0001$). No treino 6 o grupo PR-AR percorreu distâncias menores do que PR-AC e PC-AR ($P<0,05$), no treino 9, PC-AR percorreu distâncias menores do que PR-AC ($P= 0,0038$), no treino 13, PR-AC percorreu distâncias menores do que PC-AR ($P= 0,0428$) e PR-AR ($P=0,0161$), no treino 15, PR-AC percorreu menores distâncias do que PC-AR ($0,0298$). Na comparação dos dados de distância no dia do teste de retenção, não houve interação estatisticamente significante ($P=0,6171$) e não houve significância no fator alimentação ($P=0,1280$), porém, o fator programação foi significativo ($P=0,0063$), de modo que os animais programados percorreram as maiores distâncias, havendo uma diferença entre PR-AC e PC-AR ($P=0,0230$) (Figura 30).

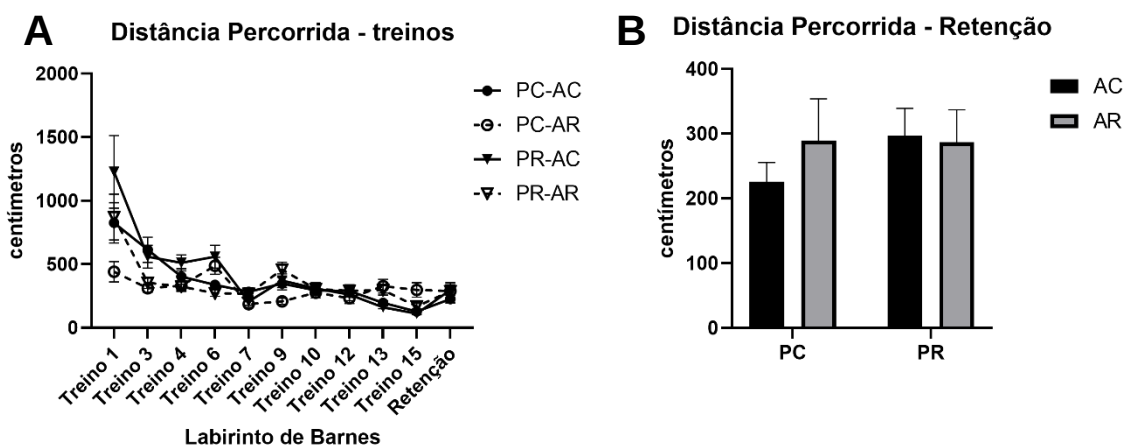


Figura 30: gráficos ilustrando a comparação entre distâncias percorridas nos treinos (A) e teste de retenção (B) do Labirinto de Barnes. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

A avaliação do tempo passado no quadrante onde estava a caixa de escape em relação ao tempo total de prova referente à fase de aquisição apresentou efeito estatisticamente significativo quanto aos treinos ($P < 0,0001$) e quanto à programação ($P = 0,0156$), mas não em relação ao fator alimentação na fase adulta, não havendo interação entre os fatores e nem diferença entre os grupos. No dia da retenção, no entanto, nenhum fator apresentou significância estatística (Programação: $P = 0,9747$; Alimentação: $P = 0,2010$; Interação: $P = 0,3460$). Nenhuma das avaliações apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 31).

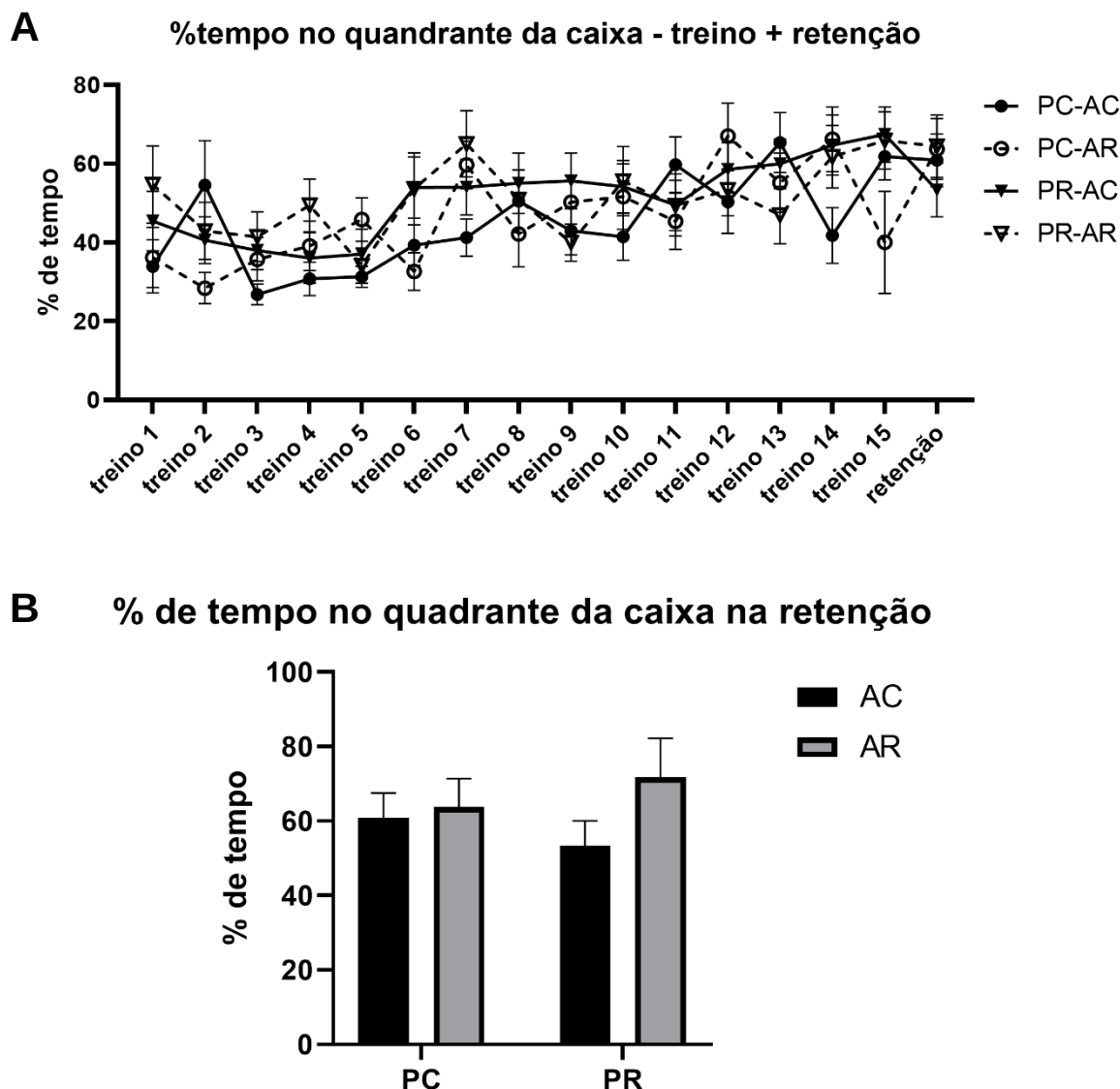
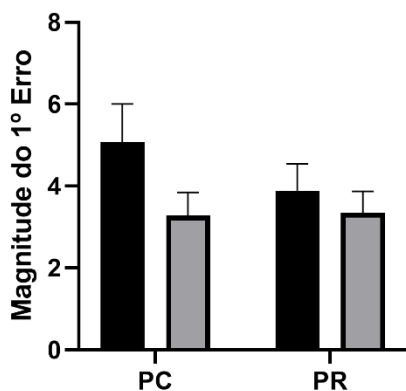


Figura 31: gráficos ilustrando os resultados referente ao tempo passado no quadrante correto no Labirinto de Barnes. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

A magnitude do primeiro erro cometido no teste de retenção e o número total de erros feitos nessa prova passaram no teste de normalidade e foram avaliados por ANOVA de 2 vias. Na comparação da magnitude do primeiro erro (Figura 32), não foi detectado efeito da interação entre os fatores e tampouco da programação ou da alimentação isoladamente. Em relação ao número total de erros não houve interação estatisticamente significativa entre programação e alimentação na vida adulta ($P=0,6171$) e tampouco significância da alimentação na fase adulta ($P=0,1280$), enquanto que para a programação foi detectado efeito ($P=0,0063$). O grupo PR-AC apresentou um número de erros maior do que PC-AR ($P=0,0230$).

Magnitude do 1º erro - Retenção



Número de erros - Retenção

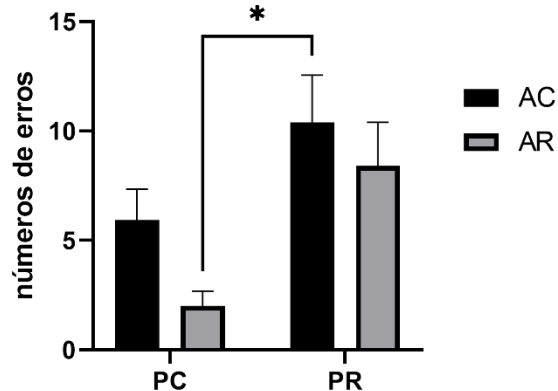


Figura 32: gráficos ilustrando os resultados do teste de retenção do labirinto de Barnes em relação aos erros cometidos pelo animal. As chaves indicam as diferenças encontradas entre os grupos. * $P=0,0230$. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita – Alimentação Restrita.

A demonstração gráfica das estratégias de busca, distância percorrida, velocidade e tempo do animal no quadrante onde está a caixa de escape puderam ser plotadas em gráficos tridimensionais de cada animal e exemplos representativos dos 4 grupos estão ilustrados na Figura 33.

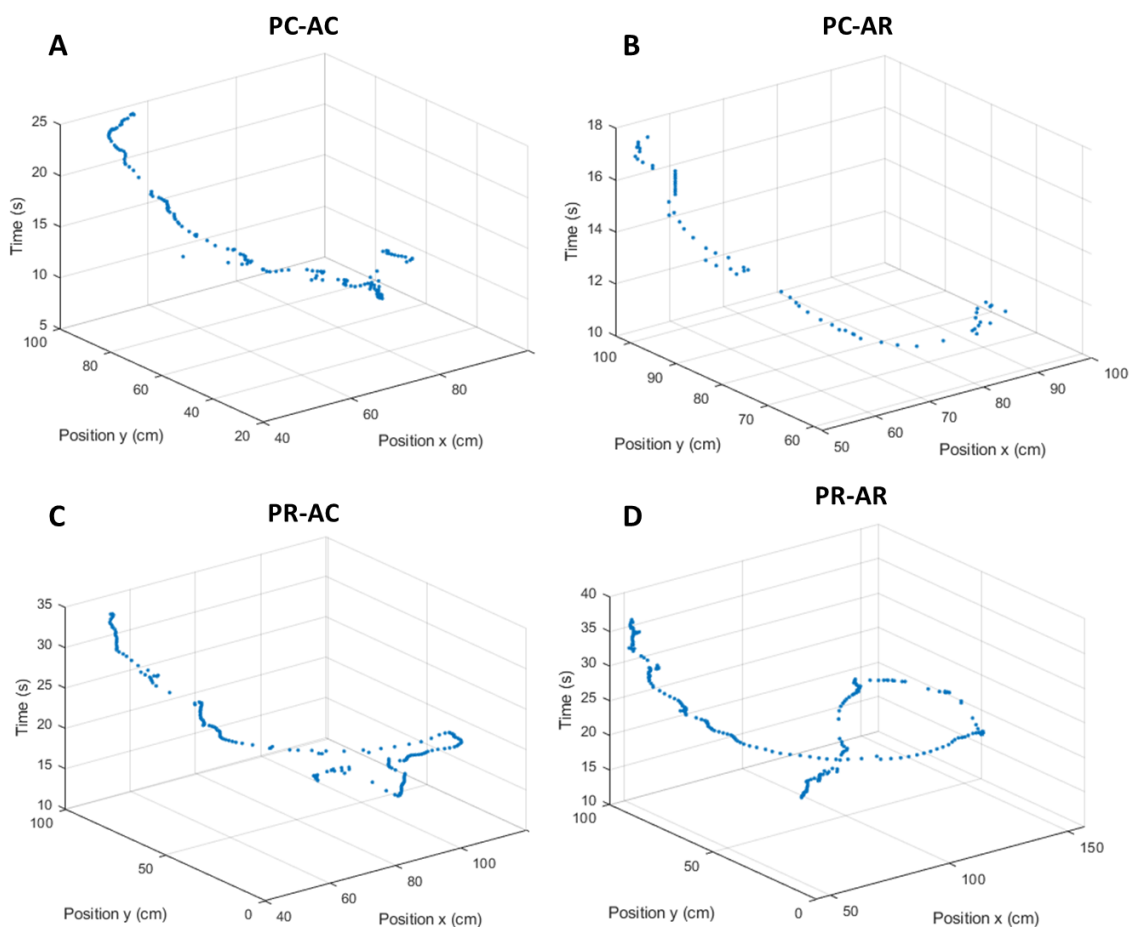


Figura 33: Gráficos ilustrando a trajetória do animal em coordenadas (X,Y) relação ao tempo (Z) no dia do teste de retenção do labirinto de Barnes. Foram escolhidos animais cuja distância percorrida se aproximasse da média do grupo experimental a que pertence. Nos gráficos A, C e D, estão caracterizadas buscas seriadas. No gráfico B, trata-se de uma busca direta. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

4.5 Análises Morfológicas

4.5.1 Tamanho do Hipocampo

A análise da área do hipocampo nas secções histológicas do hipocampo atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade e foram avaliados por ANOVA dois fatores (Figura 34).

A análise da soma de todas as secções avaliadas no hipocampo não demonstrou interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P=0,2665$), tampouco para programação ($P=0,1707$) ou para a alimentação ($P=0,2306$) isoladamente. Na análise do tamanho médio do hipocampo abrangendo os níveis de interesse também não foram encontradas diferenças significativas.

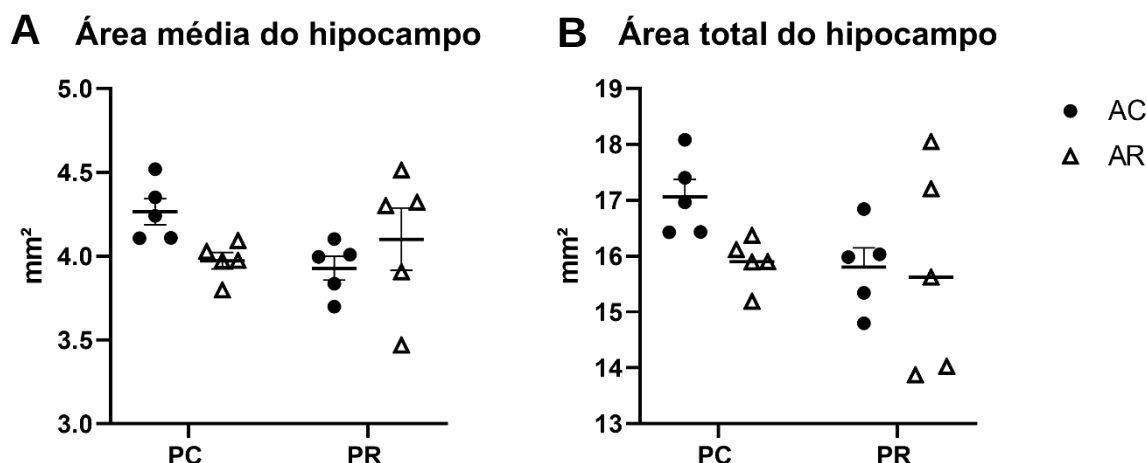


Figura 34: Gráficos ilustrando os dados obtidos na mensuração da área do hipocampo (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). A legenda em B também é válida A. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

4.5.2 Proteína FOS

A contagem de células imunorreativas à proteína FOS nas secções histológicas do hipocampo (Figura 35) atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade e foram avaliados por ANOVA dois fatores (Figura 36).

A análise conjunta de todo o hipocampo demonstrou interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,0486$). Também não houve efeitos significativos para a programação isoladamente ($P = 0,0799$) ou para alimentação ($P = 0,4862$) e não foram detectadas diferenças entre os grupos. Este resultado nos levou a analisar

as partes do hipocampo envolvidas na consolidação de memórias separadamente.

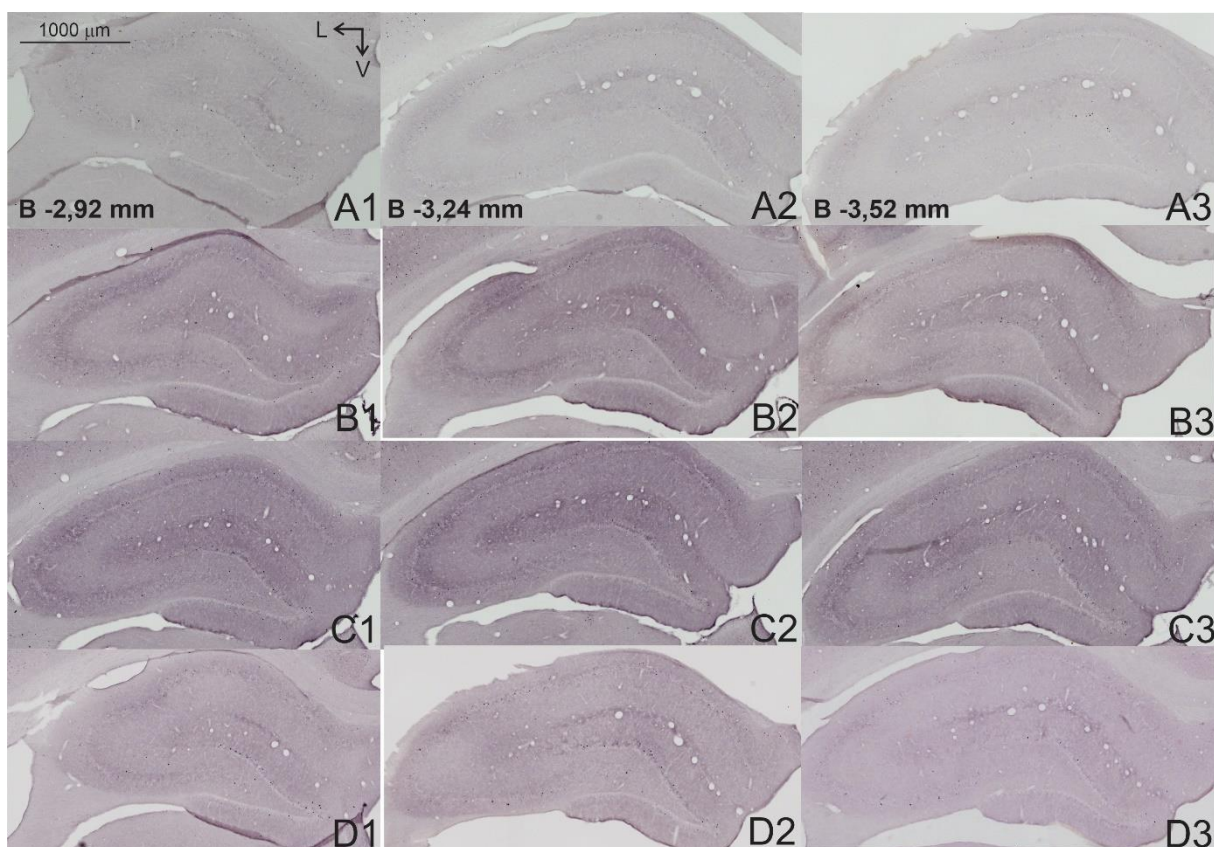


Figura 35: Fotomicrografias de secções histológicas coronais do hipocampo dorsal submetidas ao protocolo de imunohistoquímica para FOS. A: fotomicrografias do grupo PC-AC. B: fotomicrografias do grupo PC-AR. C: fotomicrografias do grupo PR-AC. D: fotomicrografias do grupo PR-AR. A barra de calibração em A1 e as setas de orientação são válidas para todas as imagens. Os valores em mm indicam a distância do plano coronal em relação ao Bregma. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

Na região CA1 houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,0459$). No entanto, não foram detectados efeitos significativos para programação ($P = 0,5909$) ou para a alimentação isoladamente ($P = 0,1697$), além de não ter havido diferenças significativas entre os grupos.

Na região CA3 não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,4732$), tampouco houve significância em relação à programação ($P = 0,0576$) ou para a alimentação isoladamente ($P = 0,4797$) e não houve diferenças significativas entre os grupos.

O Giro Denteado Superior, por sua vez, não apresentou interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,5703$) e nem na alimentação isolada ($P = 0,5703$), no entanto, a programação produziu um efeito de aumento no número de células imunorreativas a FOS ($P = 0,0110$), embora nas comparações múltiplas, diferenças não tenham sido identificadas.

No Giro Denteado Inferior houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,0095$) e também na programação de forma isolada ($P = 0,0083$), embora a alimentação separadamente não seja significativa ($P = 0,2419$). Nesta análise, Os grupos PC-AR ($20,6 \pm 2,6$), PR-AC ($24,55 \pm 2,5$) e PR-AR ($20,73 \pm 2$) apresentaram menos células imunorreativas a FOS do que PC-AC ($11,4 \pm 1,6$, $P=0,0426$; $P = 0,0033$; $P = 0,0391$, respectivamente).

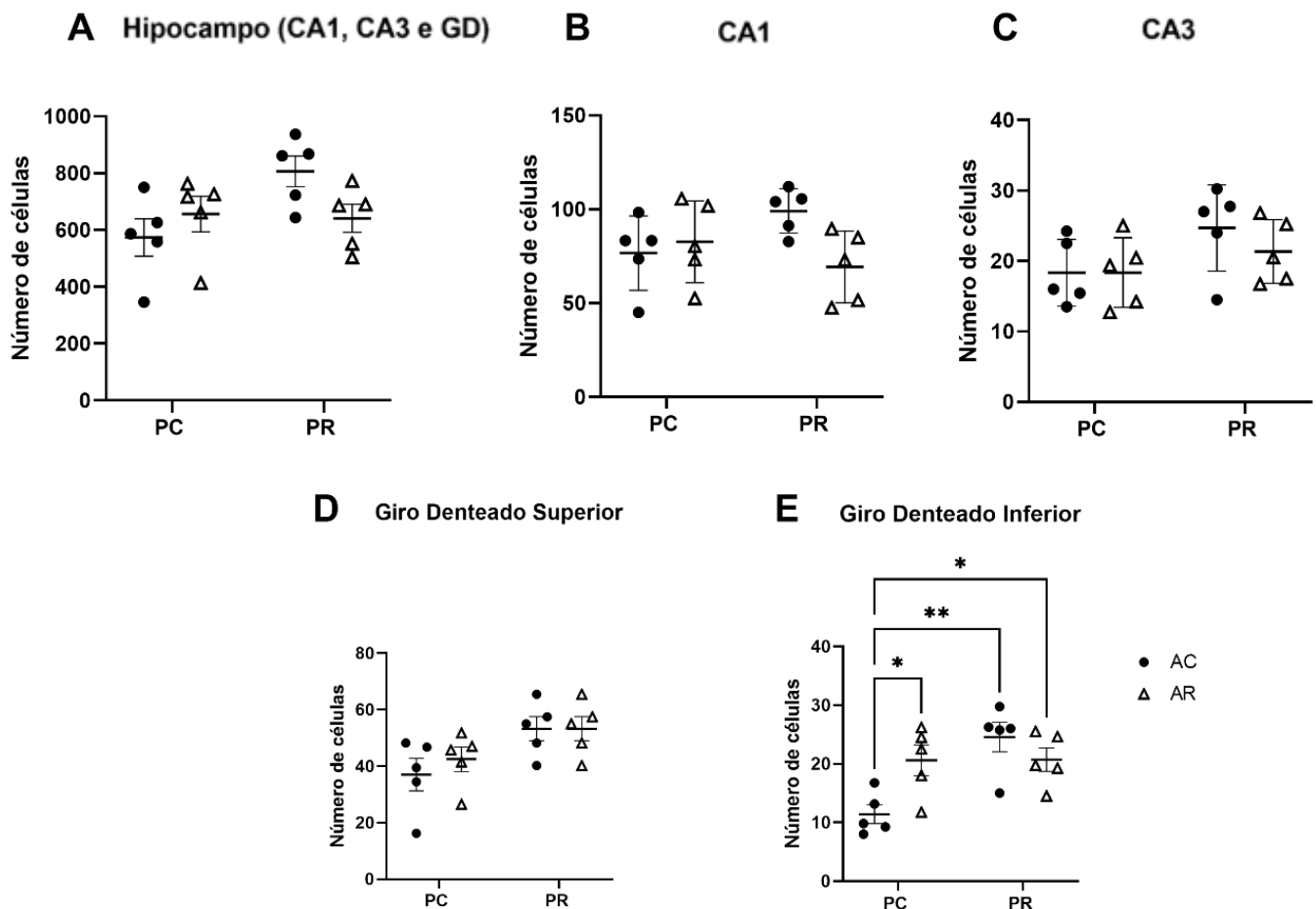


Figura 36: Gráficos ilustrando os dados obtidos na contagem de células imunorreativas a proteína FOS (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). As chaves correspondem a diferenças significativas entre os grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. A legenda em E é válida para os demais gráficos. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

4.5.3 Doublecortina

A contagem de células imunorreativas à Doublecortina nas secções histológicas do hipocampo (Figuras 37 e 38) atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade e foram avaliados por ANOVA para dois fatores.

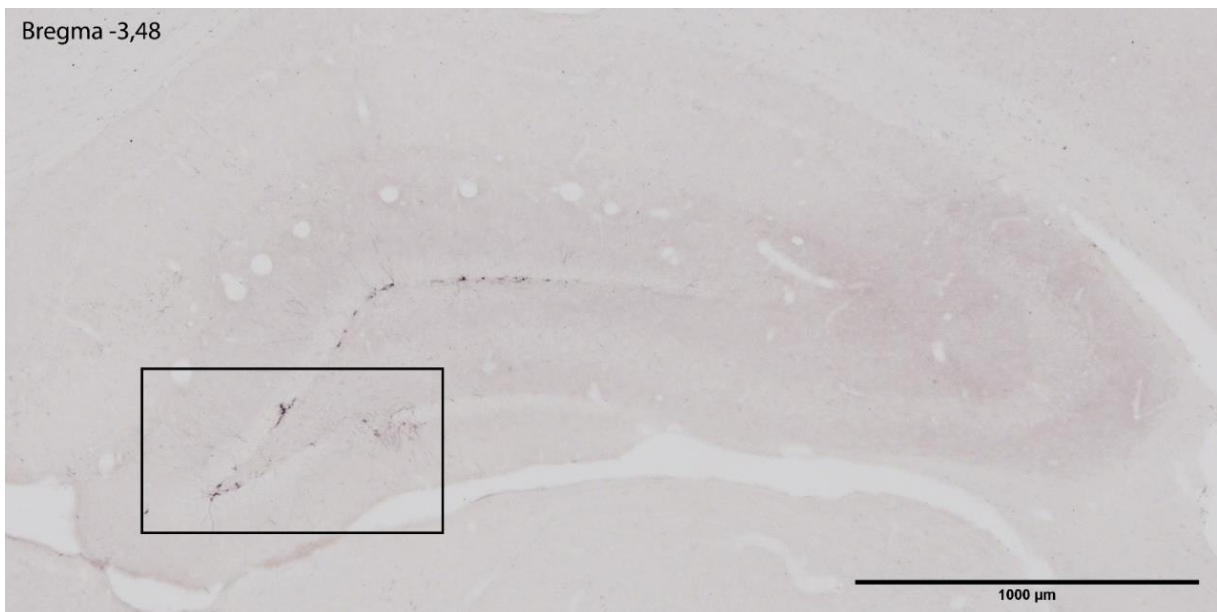


Figura 37: Fotomicrografia de secções histológica coronal do hipocampo dorsal submetida ao protocolo de imunohistoquímica para Doublecortina. A imagem corresponde a um animal pertencente ao grupo PC-AC. Os valores em mm indicam a distância do plano coronal em relação ao Bregma. A área delimitada pelo retângulo está fotografada em maior aumento na Figura 38.

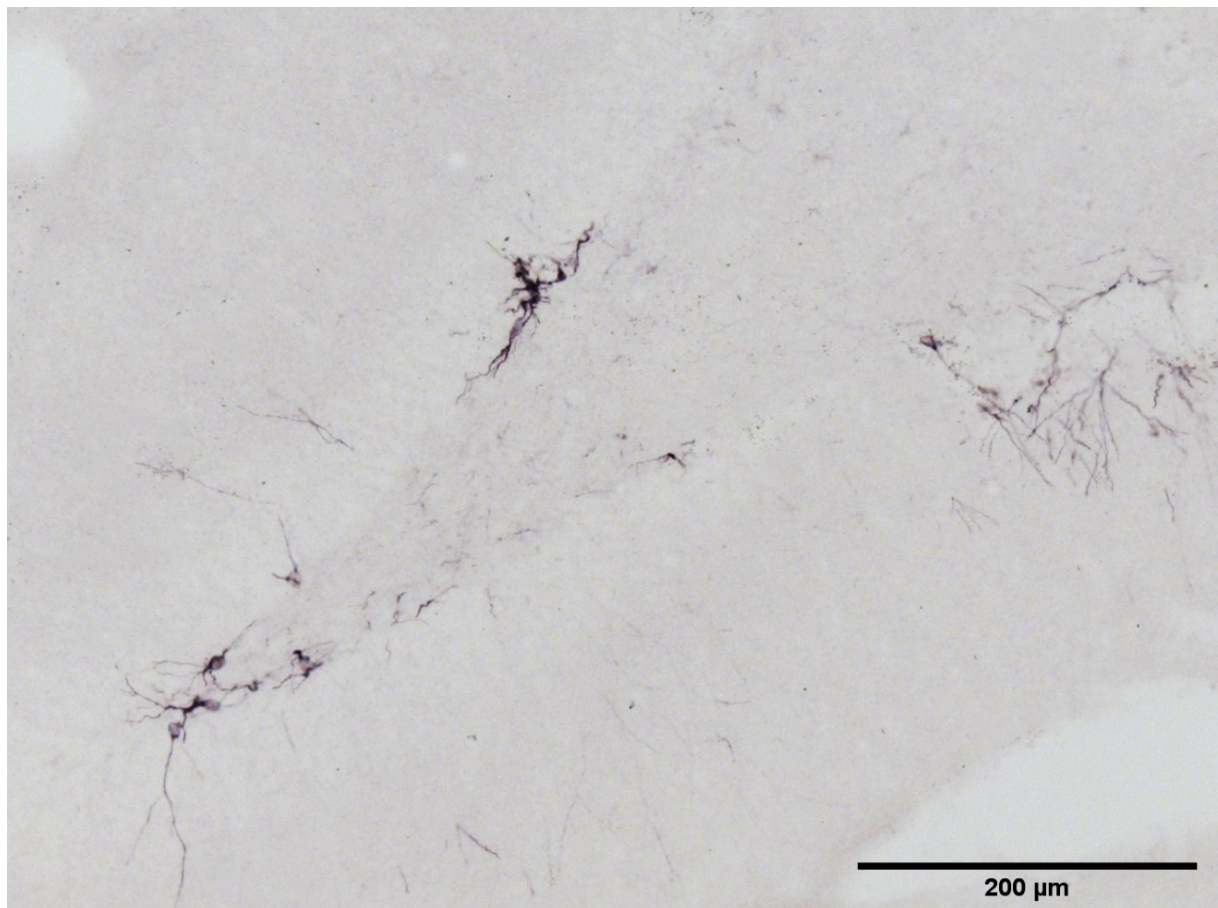


Figura 38: Fotomicrografia em maior aumento da área delimitada na figura 37. É possível visualizar de forma clara as marcações de doublecortina no Giro Denteado na região dorsal do Hipocampo.

A análise conjunta de todo o Giro Denteado não demonstrou interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,9547$), tampouco houve

diferença significativa para programação ($P= 0,0987$) e para alimentação ($P= 0,1247$) isoladamente (figura 39).

O Giro Denteado Superior também não apresentou interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P=0,7891$), nem na alimentação isolada ($P= 0,1221$) ou na programação isolada ($P = 0,2503$).

No Giro Denteado Inferior, por sua vez, o efeito da programação foi significativo ($P=0,0370$) embora tanto a interação entre a alimentação e programação ($P = 0,8626$) quanto a alimentação isolada ($P = 0,0580$) não tenham sido significativos. PR-AR ($18,2 \pm 1,428$) foi significativamente diferente de PC-AC ($P = 0,0345$; $27,25 \pm 0,285$).

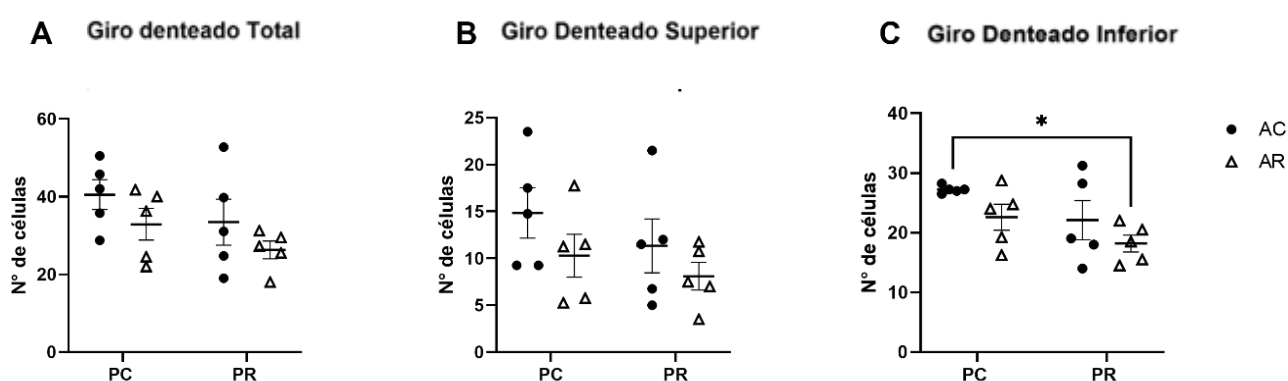
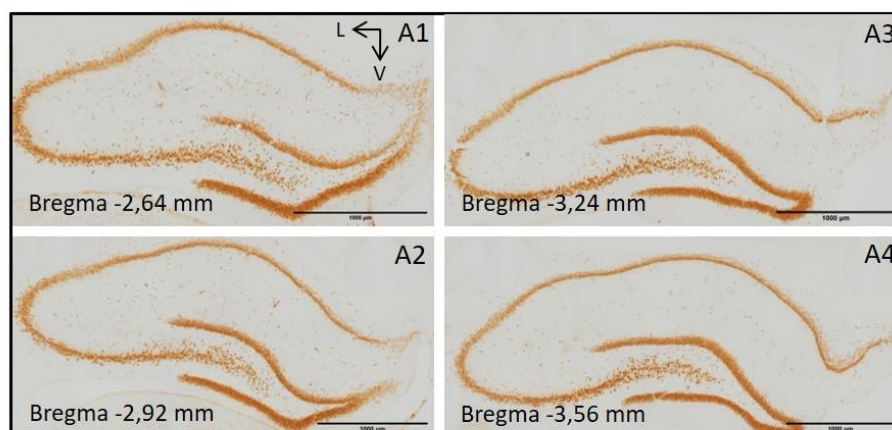


Figura 39: Gráficos ilustrando os dados obtidos na contagem de células imunorreativas a Doublecortina (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). As chaves correspondem a diferenças significativas entre os grupos. $*P<0,05$. A legenda em C é válida para os demais gráficos. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

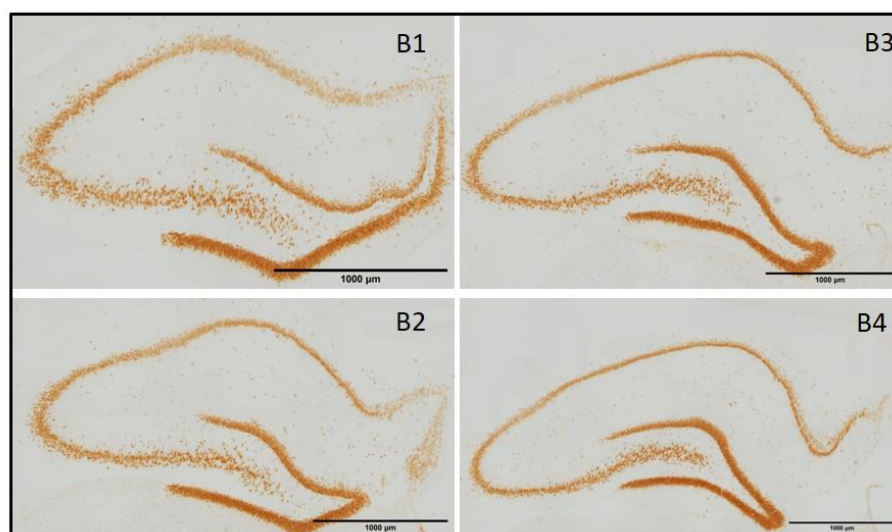
4.5.4 NeuN

A análise de densidade média das células imunorreativas a neuN nas secções histológicas do hipocampo (Figura 40) atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade e foram avaliados por ANOVA dois fatores (Figura 40).

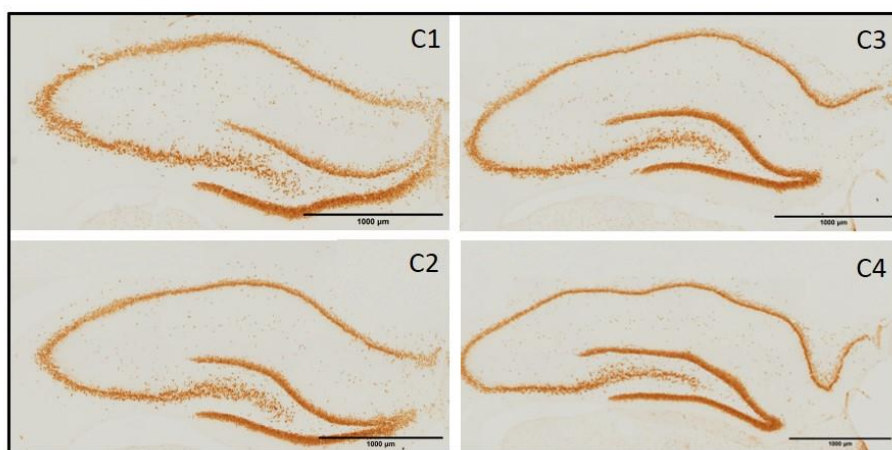
PCAC



PCAR



PRAC



PRAR

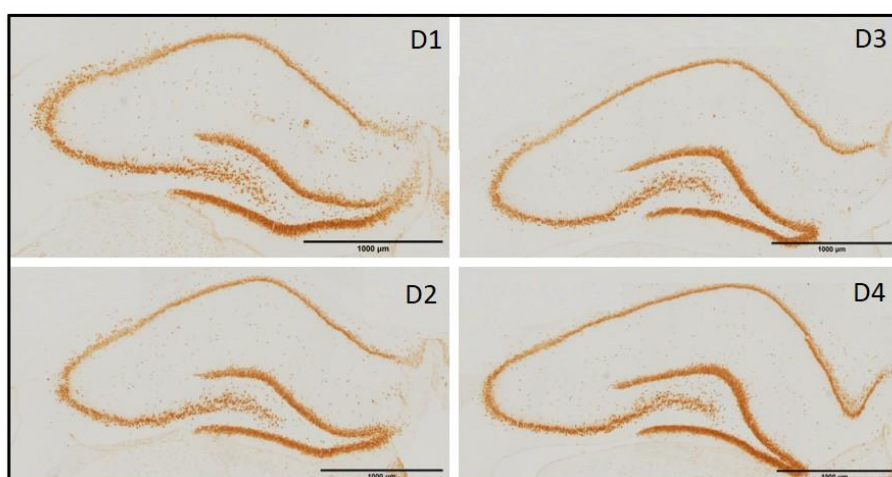


Figura 40: Fotomicrografias de secções histológicas coronais do hipocampo dorsal submetidas ao protocolo de imunohistoquímica para NeuN. A: fotomicrografias do grupo PC-AC. B: fotomicrografias do grupo PC-AR. C: fotomicrografias do grupo PR-AC. D: fotomicrografias do grupo PR-AR. As setas de orientação em A1 são válidas para todas as imagens. Os valores em mm indicam a distância do plano coronal em relação ao Bregma, para cada conjunto de imagens (A, B, C ou D), a primeira imagem (1) de cada conjunto (A1, B1, C1 e D1) corresponde aproximadamente ao bregma -2,64. As imagens 2 (A2, B2, C2 e D2) correspondem ao bregma -2,92, imagens 3 (A3, B3, C3, D3) ao bregma -3,24 e as imagens 4 (A4, B4, C4, D4) ao bregma -3,56. A escala presente em cada imagem representa 1000µm. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

A análise da densidade média na região CA1 do hipocampo não demonstrou interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P=0,5480$), e também não houve efeito significativo da alimentação ($P=0,7577$) ou da programação ($P=0,9695$) isoladamente, assim como a região CA3, em que não houve interação estatisticamente significativa entre programação e alimentação na fase adulta ($P = 0,6834$) ou efeito significativo da alimentação ($P = 0,8626$) ou da programação ($P = 0,5144$) isoladamente.

O Giro Denteado Superior, também não apresentou interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,4025$), nem na alimentação isolada ($P= 0,6359$) ou na programação isolada ($P = 0,3548$). Assim como o Giro Denteado Inferior, cuja interação não foi significativa entre a programação e alimentação na fase adulta ($P = 0,2901$), nem mesmo os efeitos isolados da alimentação ($P = 0,3368$) e programação ($P = 0,6902$).

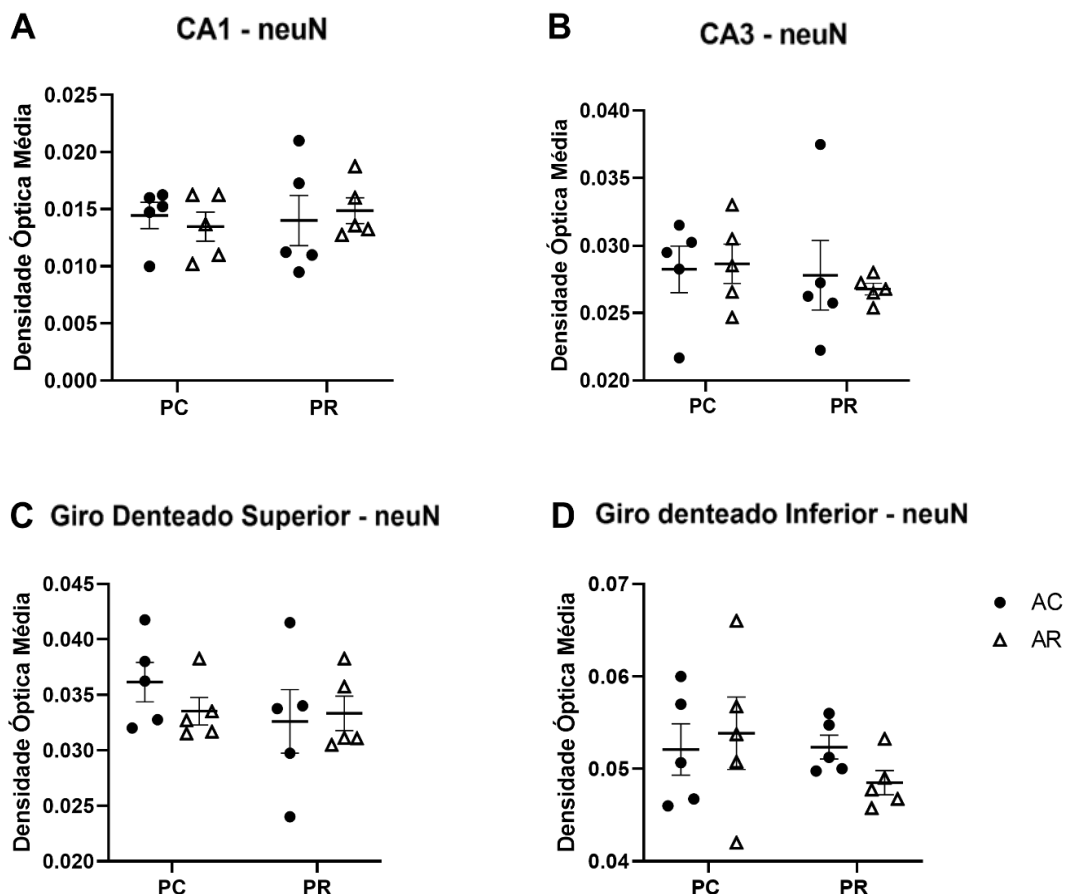


Figura 41: Gráficos ilustrando os dados obtidos na análise de densidade óptica de células imunorreativas à neuN (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). A legenda em D é válida para os demais gráficos. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita - Alimentação Restrita.

4.5.5 GFAP

A densidade óptica de células imunorreativas ao GFAP nas secções histológicas do hipocampo atendeu aos critérios de normalidade e homoscedasticidade e foram avaliados por ANOVA dois fatores (Figura 42).

A análise da densidade média do CA1 demonstrou que não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,7565$). Da mesma maneira, não houve significância para o efeito isolado da programação ($P = 0,5734$) e da alimentação na fase adulta ($P = 0,1138$).

Na região CA3 também não houve interação estatisticamente significativa entre programação e a alimentação na fase adulta ($P = 0,3190$), assim como não houve significância da programação ($P = 0,5099$) e da alimentação ($P = 0,0877$) isoladamente.

No Giro Denteado superior e no inferior também não houve significância estatística para nenhum dos fatores avaliados.

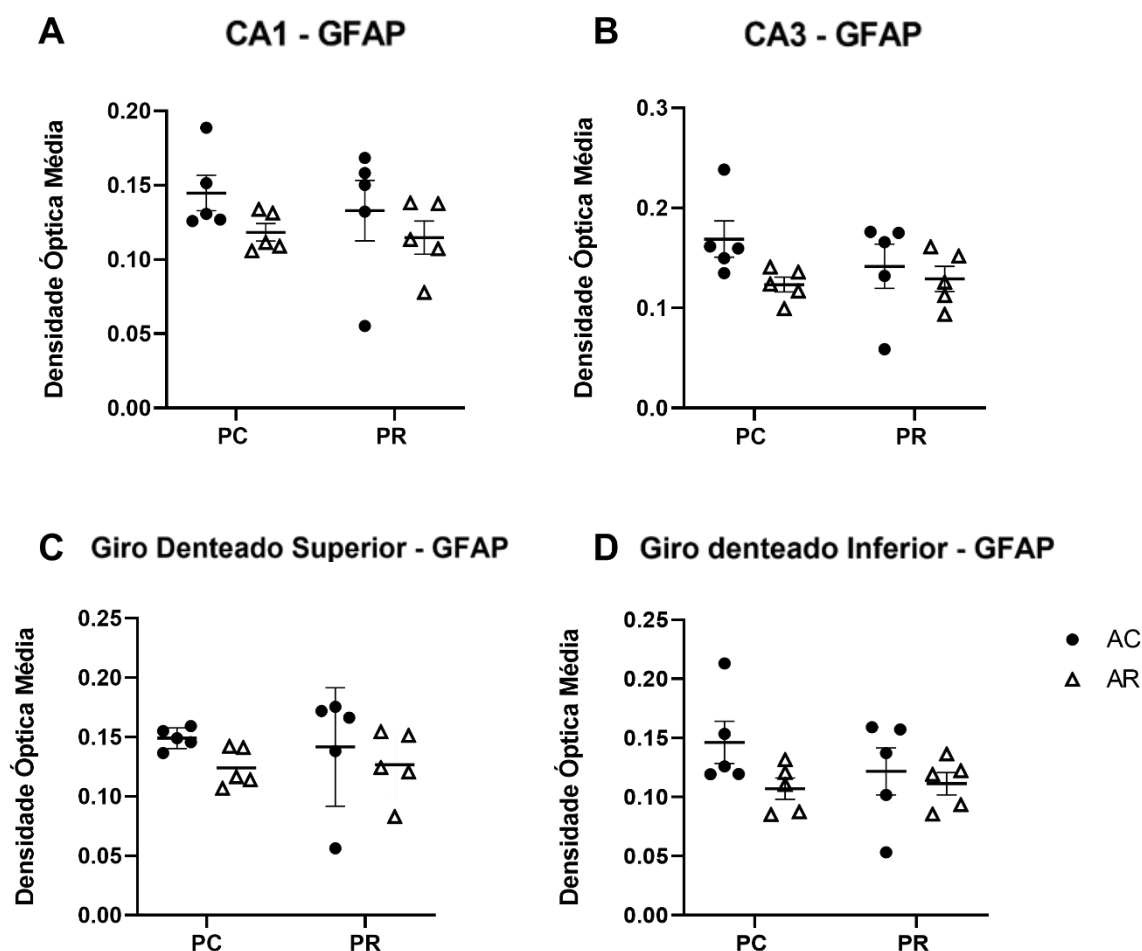


Figura 42: Gráficos ilustrando os dados obtidos na densidade óptica de células imunorreativas ao GFAP (média e erro típico da média, ANOVA 2 fatores). A legenda em D é válida para os demais gráficos. PC-AC= Programação Controle – Alimentação Controle; PC-AR= Programação Controle – Alimentação Restrita; PR-AC= Programação Restrita – Alimentação Controle; PR-AR= Programação Restrita – Alimentação Restrita.

5. DISCUSSÃO

5.1 Preferência Alimentar

Apesar da preferência alimentar poder ser influenciada durante a fase perinatal, nas condições de restrição alimentar deste trabalho apenas uma diferença entre os grupos foi detectada. A diferença ocorreu no coeficiente de preferência da dieta hiperglicídica após 12 horas de exposição, momento em que o grupo Programação restrito apresentou maior preferência pela dieta enriquecida do que o grupo controle, embora o grupo controle também prefira a dieta enriquecida em relação à normal neste intervalo. Nos demais intervalos e nas outras opções de dieta, os grupos não apresentaram diferenças no coeficiente de preferência.

O trabalho de Bellinger et al., 2004 indicou uma maior preferência por alimentos com maior teor de gorduras em ratos jovens adultos que foram programados com uma dieta com redução da quantidade de proteínas durante toda gestação. Com base nessa informação, esperávamos encontrar um resultado similar, em que os animais programados preferissem diferencialmente dietas hiperlipídicas pelo fato de os lipídios apresentarem maior densidade energética do que os demais macronutrientes, porém não foi este o resultado observado. Apesar de a restrição alimentar total também implicar em uma redução da quantidade de proteínas ingeridas, é possível que manutenção da fonte e da proporção energética seja o suficiente para que o animal atinja a homeostase, dificultando a comparação dos resultados com trabalhos que reduziram nutrientes específicos. Neste trabalho que está sendo realizado o animal permanece recebendo uma dieta balanceada e apresenta um fenótipo correspondente e que suporta a redução alimentar, pois ele sofre alterações majoritariamente em termos de tamanho.

Alguns trabalhos têm relatado efeitos similares entre a restrição calórica e a restrição proteica ao longo da vida (SOLON-BIET *et al.*, 2015), enquanto outros autores procuram delimitar melhor o papel de cada tipo dieta. Já foi indicado que a proporção de macronutrientes como potencializador da longevidade é mais relevante do que a redução de calorias propriamente dita (SOLON-BIET *et al.*, 2014), ao mesmo tempo em que outros estudos apontaram o oposto, colocando a restrição calórica como principal fator benéfico para a longevidade (SPEAKMAN *et al.*, 2016).

Outro aspecto a ser levado em consideração é que o efeito da Programação depende da duração do estímulo indutor, da intensidade e da fase gestacional que ele atinge (BELLINGER

e LANGLEY-EVANS, 2005). A dieta que foi aplicada na fase de programação em nosso estudo é bastante intensa e duradoura, visto que reduz em 50% a alimentação e abrange a gestação e a lactação. A magnitude do estímulo junto ao fato de o balanceamento da dieta estar sendo mantido e de a intervenção perdurar durante o período lactação podem ser justamente os fatores responsáveis pela diferença do resultado em relação à trabalhos anteriores investigando o papel do desenvolvimento intrauterino na preferência alimentar.

De todo modo, ainda não parece haver um consenso claro na literatura sobre os mecanismos e influência de cada tipo de nutriente, portanto, ainda é possível hipotetizar que o programação por restrição alimentar durante a prenhez e lactação possa induzir outras modificações na preferência alimentar, circunstância que talvez pudesse ser observada aumentando-se o tempo de oferta das dietas enriquecidas, que neste trabalho foi apenas de 3 dias. Diferenças entre modelos experimentais também não podem ser descartadas, visto que muitos dos trabalhos que se propõem a investigar a preferência alimentar utilizam camundongos.

5.2 Dados biométricos

Os dados de índice de Eficiência e de Conversão Alimentar não foram diferentes entre os grupos, apesar de o grupo Programação Restrita ter apresentado pesos estatisticamente menores do que o grupo Programação Controle. Isso é consistente com o fato de que os animais programados, independente de terem recebido dieta na idade adulta, mantiveram-se com pesos menores do que os controles até o fim da vida, conforme observado na curva de peso. Assim sendo, é compreensível que o grupo programado não tenha apresentado um índice de conversão alimentar que fosse permitir que ele alcançasse o grupo controle em relação a esta medida.

Os dados de glicemia avaliados foram baixos em todos os grupos em relação ao valor de referência. Embora tenha havido diferenças entre grupos de mesma programação, é possível perceber que grupo programado no geral apresentou uma média um pouco maior que o grupo que não recebeu programação, além disso, os animais programados tiveram uma variabilidade muito maior do que o grupo controle, como evidenciado pelo erro típico da média presente no gráfico.

As comparações dos dados biométricos de peso, distância naso-anal e gorduras obtidos no dia da perfusão foram estatisticamente significativas entre os grupos e comportaram-se de forma correspondente à ingestão calórica. Os animais que não tiveram nenhum tipo de restrição alimentar apresentaram os maiores valores em todas as análises, enquanto os animais que fizeram 2 restrições apresentaram os menores valores. Esses dados são relevantes para a percepção da magnitude da restrição realizada, pois eles atestam que a dieta de fato surtiu

efeitos perceptíveis.

Os dados de gordura, inclusive, mostram que as dietas nas duas fases da vida atuaram como redutoras do tecido adiposo. O coeficiente de adiposidade, por outro lado, mostrou que a programação por restrição é um fator mais determinante do que a restrição alimentar na fase adulta para a manutenção das reservas energéticas, visto que os animais que realizaram a dieta somente na fase adulta não apresentaram diferença em relação ao controle, sendo importante considerar que a restrição durante a prenhez e lactação ocorreu num período mais determinante e foi mais severa (50%), do que a restrição que optamos por aplicar na fase adulta (30%).

Na programação por restrição alimentar aqui realizada não foi observado o fenômeno de “Catch up”, provavelmente devido ao fato de o estímulo programador ter sido mantido durante a lactação, fazendo com que a principal janela de recuperação do tamanho corporal não tenha sido utilizada com esta finalidade, de modo que a programação pôde de fato atuar como uma adaptação ao ambiente fora do útero após o nascimento, determinando um peso menor pelo resto da vida dos animais. Essa constatação está em consonância com estudos que avaliaram o aumento de gordura, a ocorrência de obesidade e outras alterações metabólicas em animais cuja programação por 50% de restrição alimentar aconteceu somente durante a gestação, mas não durante a lactação (LEE, 2013).

Outros achados na literatura apontam ainda um efeito metabólico positivo de redução da ocorrência de obesidade e menor resistência à insulina induzido por programação por restrição calórica, porém, tratando-se de uma restrição mais branda e num período menos extenso, como por exemplo, uma redução de 30% da alimentação somente durante a lactação (PALOU *et al.*, 2010). Devido às janelas de programação, a restrição calórica pós-natal precoce (durante a lactação) pode ser uma possível via de proteção contra a obesidade em machos com restrição de crescimento intrauterino, possibilitando que se especule que talvez a própria restrição no período de lactação seja o contendor dos efeitos da restrição calórica no período gestacional (GARG *et al.*, 2012), assim, nossos achados em relação ao tamanho e ocorrência de doenças metabólicas estão em consonância com a literatura.

O tamanho do encéfalo, por sua vez, só apresentou diferença entre os grupos com programações fetais diferentes (PC-AC e PC-AR maiores do que PR-AC e PR-AR), de forma que a dieta realizada na idade adulta não impactou no tamanho deste órgão. Este era um resultado esperado, visto que na idade adulta o encéfalo não se encontra mais em um período tão crítico de desenvolvimento quanto na fase perinatal, além do fato de este órgão ser priorizado na distribuição nutricional, conforme a teoria do cérebro egoísta. Essa teoria afirma que existe uma hierarquização da distribuição de energia em que o cérebro é o órgão prioritário,

de modo que a restrição calórica pode induzir mudanças sutis no encéfalo ao mesmo tempo que causa mudanças intensas no metabolismo (SPRENGELL *et al.*, 2021). No caso da programação, por outro lado, a deflagração da diminuição do peso do encéfalo evidencia justamente uma adaptação na fase chave do desenvolvimento para que este encéfalo possa permanecer funcional em seu ambiente, sendo correspondente ao fenótipo menor dos animais programados.

A teoria do cérebro egoísta inclusive da suporte aos dados obtidos a partir do cálculo do coeficiente de encefalização, onde é visto que a restrição na idade adulta gerou coeficientes maiores de encefalização do que os do grupo controle ou do grupo somente programado, justamente porque essa restrição gerou redução do peso corporal através da perda de tecidos como gorduras e outras reservas energéticas, mantendo o encéfalo preservado, o que faz com o que o coeficiente aumente, dado que se trata de uma razão.

As diferenças nas razões isotópicas demonstraram que a restrição quantitativa de alimentos foi realmente capaz de causar mudanças na constituição corporal do animal, de modo que a programação aumentou a razão de carbono 13, enquanto a restrição adulta no animal não programado diminuiu a razão isotópica do nitrogênio 15. Ainda não há clareza na literatura sobre a via que produz esse efeito, mas alguns estudos visam utilizar essas marcações isotópicas como um indicador de desnutrição, inclusive utilizando cabelo humano [26].

5.3 Comportamento

Observando em conjunto os dados do campo aberto e do labirinto em cruz elevado, é possível perceber que a dieta aplicada não causou diferenças que sugiram a indução de comportamentos similares à ansiedade nos animais que sofreram restrição em qualquer período. Esse dado é importante para eliminar o viés de que algum potencial efeito da dieta tenha ocorrido em virtude do estresse causado aos animais pela restrição, ao invés de ser atribuído à redução da disponibilidade nutricional propriamente dita e aos mecanismos do DOHaD. Este dado não foi de todo inesperado, visto que alguns trabalhos que realizaram restrição calórica na vida adulta a indicaram como um potencial estímulo redutor de ansiedade em camundongos (PARIKH *et al.*, 2016).

Na exploração, os grupos programados apresentaram mais levantares do que o grupo controle, enquanto a análise com agrupamento somente em relação à programação, desconsiderando a restrição na fase adulta, foi visto que os animais programados apresentaram menos imobilidade e mais auto-limpeza que os controles. Isso pode indicar que a programação fez com que os animais se sentissem mais seguros ou mais curiosos para a exploração, o que

pode significar que se tratam de animais mais adaptados para lidar com situações potencialmente estressoras, como um novo ambiente. O grupo PC-AR inclusive apresentou menor deambulação periférica do que PR-AC e PR-AR, corroborando a diferença na exploração induzida pela programação. Os animais aqui avaliados, de forma geral, preferiram explorar mais as sessões periféricas, conforme esperado para a espécie (STURMAN *et al.*, 2018; ESTANISLAU *et al.*, 2019).

Nos dados de Reconhecimento de Novo Objeto e de Localização de Objeto também não foram detectadas diferenças. Essa ausência de diferenças entre os grupos não programados pode estar relacionada com o período curto de aplicação da dieta na fase adulta, que durou 40 dias, correspondendo ao período da programação. Trabalhos que relataram o aumento do desempenho de memória e aprendizagem com a restrição alimentar na vida adulta fizeram a dieta por períodos maiores, como, por exemplo, 10 meses de aplicação de uma dieta hipocalórica (30% de redução) em camundongos (DONG *et al.*, 2016). Por outro lado, a ausência de diferença entre os grupos programados pode ter acontecido devido aos fenômenos de adaptação e à própria condição do cérebro egoísta, que buscou sua própria homeostase primariamente.

A idade de adulto jovem dos animais utilizados neste estudo é um fator que pode tornar menos nítido o efeito benéfico da restrição adulta e o efeito deletério da programação, pois nesta idade os animais ainda não se encontram numa fase de declínio cognitivo que tornaria mais perceptíveis as mudanças entre os grupos. Muito dos efeitos benéficos da restrição calórica estão implicadas em mecanismos que retardam o envelhecimento (MARTI-NICOLOVIUS e AREVALO-GARCIA, 2018), ou, de fato, dependem que a restrição ocorra ao longo da vida em roedores (KUHLA *et al.*, 2013). Um outro fator a ser apontado pode ser a inespecificidade dos testes experimentais de NORT e OLT em específico, visto que em outros testes, como o Labirinto de Barnes, os animais apresentaram desempenhos diferentes.

O grupo PR-AC teve um desempenho pior do que os demais grupos no labirinto de Barnes, em que de forma geral, este grupo percorreu as maiores distâncias para chegar na caixa de escape e apresentou as maiores latências. Ademais, o grupo programado, independente da dieta adulta, foi o grupo que apresentou o maior percentual de uso de estratégia seriada no dia do teste de retenção em detrimento da estratégia de busca direta. Os animais que receberam a restrição na idade adulta independentemente da programação prévia, por outro lado, tiveram aumento da adesão ao uso de estratégia direta no dia do teste de retenção.

Este resultado de uso de estratégia no teste de retenção foi diferente do observado na análise do uso de estratégias na fase de aquisição, pois na aquisição o grupo programado sem

dieta na idade adulta usou mais a estratégia direta do que a seriada, condição que se invertou no teste final. Essa dissonância de dado pode significar que o animal programado (PR-AC) não foi capaz de consolidar a memória espacial de forma tão eficiente, embora tenha tido uma boa performance anterior de aprendizado. Essa análise, embora seja classificatória, pode ser muito pertinente quando considerado o animal em termos de vida em seu habitat natural, em que existe a chance de ele ser predado. É possível especular que um animal que é capaz de memorizar e encontrar sua toca por estratégia de busca direta, por exemplo, terá mais chances de se esconder eficientemente de um predador do que um animal que utiliza uma busca aleatória ou seriada, que provavelmente passa mais tempo exposto aos riscos.

Os grupos que receberam a restrição alimentar na fase adulta, além de aparentemente terem tido uma consolidação de memória melhor, evidenciada pelo emprego da estratégia de busca direta na fase de retenção, também apresentaram latências e distâncias menores do que o grupo somente programado (PR-AC) em diversos momentos da fase de aquisição e também de retenção. O que chama atenção é que o grupo duplamente restrito (PR-AR) se sobressaiu ao grupo restrito somente na fase adulta (PC-AR) em relação à distância percorrida no labirinto, e embora o grupo somente programado (PR-AC) tenha tido um número maior de erros no teste de retenção do que o somente restrito na fase adulta (PC-AR), essa diferença não foi mantida nos animais duplamente restritos (PR-AR). Esse resultado pode ser atribuído em uma primeira análise à uma maior adaptação do animal programado à baixa disponibilidade de alimento do que um animal controle, em que seu encéfalo responde ainda melhor a menores quantidades de radicais livres, isto estaria considerando então que a dieta adulta por si própria é capaz de facilitar a recuperação da capacidade cognitiva dos animais programados, já que ela conhecidamente tem efeito positivo para o cérebro e os processos de memória e aprendizagem e animais poderiam ser ainda mais sensíveis a seus efeitos. Outro fator que poderia estar relacionado com esse resultado é adaptação dos animais programados a condições estressantes propriamente ditas, sendo que esta segunda hipótese inclusive justificaria a ausência de diferenças significativas entre os grupos no teste de Reconhecimento de Novo Objeto e Localização de Objeto, visto que estes dois testes não se valem de um ambiente tão aversivo quanto o labirinto de Barnes, ou seja, a habituação ao estresse precoce pode estar implicada neste resultado. A terceira possibilidade, também correlacionada com a resposta ao estresse seria o fato de os animais que sofreram duas restrições serem mais responsivos ao estresse do que o grupo apenas programado, de forma que sua motivação para realizar a busca de forma mais eficiente torna-se maior. De forma geral, em relação aos grupos já conhecidos (somente programado ou somente com a dieta na fase adulta), os resultados do labirinto de Barnes estão

em consonância com os relatos anteriores na literatura, embora os resultados no jovem adulto sejam mais sutis do que em outras fases.

5.4 Morfologia

A análise da expressão de proteína FOS no hipocampo foi consistente com relatos da literatura que apontam o giro denteado como uma estrutura hipocampal particularmente sensível. Embora as demais áreas do hipocampo também sejam relevantes para a consolidação de memórias, foi no giro denteado que as diferenças entre os grupos foram encontradas. Nesta análise, todos os grupos que receberam dieta, seja como forma de programação ou na idade adulta, apresentaram mais células expressando FOS do que o grupo controle. O grupo somente programado (PR-AC) foi o que apresentou a maior quantidade de neurônios ativados, e no gráfico desta análise é possível perceber que PC-AR e PR-AR, os grupos que receberam dieta somente na idade adulta ou em ambas as idades, estão muito perto de se equivaler, o que justifica a detecção de interação entre a dieta e a programação.

O aumento da expressão de fos no grupo Programado divergiu de alguns achados anteriores na literatura. O resultado diferente na expressão da proteína entre os grupos é intrigante, visto que o desempenho dos animais na tarefa do OLT não apresentou nenhuma diferença significativa. Apesar disso, este desempenho na tarefa de localização de objeto provavelmente está mais correlacionado com a expressão de c-fos em CA1 (MENDEZ *et al.*, 2015), região onde não detectamos diferenças.

Uma hipótese para este dado é pensar a restrição alimentar como uma promotora de ativação neural independente da fase em que ela ocorre, porém, com esta hipótese, em nosso trabalho não é possível afirmar se isso de fato se traduz em algum significado funcional relevante. Por outro lado, também é possível especular que na realidade os animais com a maior expressão de proteína FOS estão precisando recrutar mais células para chegar ao mesmo desempenho do grupo controle no OLT, ou seja, há uma perda de eficiência de atividade neural, requerendo um caminho menos otimizado. Neste caso, a programação pode ser vista como uma diminuidora de eficiência que é atenuada pela restrição adulta, visto que perde-se a magnitude do efeito com a restrição combinada, e isto estaria em conformidade com os resultados observados no Labirinto de Barnes. Esta segunda hipótese ainda faz sentido do ponto de vista adaptativo, visto que o cérebro dos animais pode estar programado para funcionar sob menor quantidade de radicais livres, que são produtos do metabolismo normal e se correlacionam com a quantidade de alimento ingerida (TREVIÑO *et al.*, 2015).

Em relação à neurogênese, na região inferior do giro denteado houve significância da programação, sendo que o grupo PR-AR apresentou menos marcação do o grupo controle,

enquanto nos demais casos não houve diferença. Neste caso, a programação está sendo, de fato, um agente redutor da neurogênese, e esse efeito se manifestou quando aplicada a restrição alimentar na fase adulta. Neste caso não observamos uma correlação funcional direta do desempenho de memória e aprendizado com a neurogênese, dado que nenhum dos outros grupos com restrição foram diferentes do grupo controle.

Na análise da densidade média referente aos protocolos de imunohistoquímica para neuN e GFAP não foram detectadas alterações entre os grupos, o que provavelmente significa que não aconteceram amplas modificações estruturais nos animais frente aos estímulos aqui propostos, o que é corroborado pelo fato de que não houve alteração em relação ao tamanho do hipocampo, endossando novamente a hipótese do cérebro egoísta e a preservação das capacidades de memória e aprendizagem, que possuem alto valor adaptativo, isto porque os animais apresentaram diferenças corporais substanciais em outros órgãos mas não nesta estrutura. Assim, somente as medidas mais marcadamente sensíveis associadas à plasticidade, como a neurogênese e a ativação neuronal apresentaram alterações.

6. CONCLUSÃO

A partir da análise dos dados podemos concluir que a programação por restrição alimentar durante a prenhez e lactação gerou diversas alterações na prole, incluindo aumento da preferência alimentar à dieta hiperglicídica na infância, redução do tamanho do animal, diminuição do peso corporal e do peso encefálico na idade adulta, além de ter aumentado a ativação neuronal, a tendência exploratória dos animais e gerado prejuízo na memória espacial de longo prazo, mostrando que a redução alimentar durante a gestação e lactação realmente implica em mudanças no comportamento e no encéfalo na idade adulta.

A restrição alimentar realizada somente na idade adulta também produziu alterações biométricas e aumento da ativação neuronal, além de ter gerado um melhor desempenho de memória espacial de longo prazo. Neste ponto é necessário levar em consideração que se trata de uma dieta perfeitamente balanceada, que nem sempre é possível de ser realizada em condições fora do laboratório.

Ademais, as restrições isoladas em qualquer uma das fases ou mesmo combinadas foram capazes de deflagar alterações nas razões isotópicas detectadas no pêlo, indicando modificação da constituição corporal do animal. Por outro lado, nenhuma das dietas gerou aumento do perfil ansiogênico desses animais, tampouco alterações na memória de reconhecimento e localização de objetos ou mudanças no tamanho e citoarquitetura hipocampais, mostrando uma excelente capacidade de adaptação do sistema nervoso.

Com relação especificamente à combinação de dietas em diferentes períodos da vida, houve uma interação benéfica em várias das circunstâncias avaliadas, como a atenuação da quantidade de erros no teste de retenção de memória dos animais programados, muito embora tenha ocorrido também uma redução da neurogênese hipocampal no giro denteado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKLAND, F. M.; PREECE, M. A. Catch-up growth. **Pediatrician**, v. 14, p. 226-33, 1987.
- ADAMSKY, A.; GOSHEN, I. Astrocytes in memory function: Pioneering findings and future directions. **Neuroscience**, v. 370, p. 14-26, 2018.
- ADAMSKY, A.; KOL, A.; KREISEL, T.; DORON, A.; OZERI-ENGELHARD, N.; MELCER, T.; REFAELI, R.; HORN, H.; REGEV, L.; GROYSMAN, M.; LONDON, M.; GOSHEN, I. Astrocytic activation generates de novo neuronal potentiation and memory enhancement. **Cell**, v. 174, p. 59-71.e14, 2018.
- AKITAKE, Y.; KATSURAGI, S.; HOSOKAWA, M.; MISHIMA, K.; IKEDA, T.; MIYAZATO, M.; HOSODA, H. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. **Nutr Res**, v. 35, p. 76-87, 2015.
- AKKERMAN, S.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Mind the gap: Delayed manifestation of long-term object memory improvement by phosphodiesterase inhibitors. **Neurobiol Learn Mem**, v. 109, p. 139-43, 2014.
- AKKERMAN, S.; BLOKLAND, A.; RENEERKENS, O.; VAN GOETHEM, N. P.; BOLLEN, E.; GIJSELAERS, H. J.; LIEBEN, C. K.; STEINBUSCH, H. W.; PRICKAERTS, J. Object recognition testing: Methodological considerations on exploration and discrimination measures. **Behav Brain Res**, v. 232, p. 335-47, 2012.
- BĂDESCU, S. V.; TĂTARU, C. P.; KOBYLINSKA, L.; GEORGESCU, E. L.; ZAHIU, D. M.; ZĂGREAN, A. M.; ZĂGREAN, L. Effects of caffeine on locomotor activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Med Life**, v. 9, p. 275-279, 2016.
- BAIK, S. H.; RAJEEV, V.; FANN, D. Y.; JO, D. G.; ARUMUGAM, T. V. Intermittent fasting increases adult hippocampal neurogenesis. **Brain Behav**, v. 10, p. e01444, 2020.
- BARKER, D. J. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatr Suppl**, v. 93, p. 26-33, 2004.
- BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, p. 412-7, 2007.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in england and wales. **Lancet**, v. 1, p. 1077-81, 1986.
- BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 93, p. 74-104, 1979.
- BARTSCH, T.; WULFF, P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. **Neuroscience**, v. 309, p. 1-16, 2015.
- BATESON, P.; BARKER, D.; CLUTTON-BROCK, T.; DEB, D.; D'UDINE, B.; FOLEY, R. A.; GLUCKMAN, P.; GODFREY, K.; KIRKWOOD, T.; LAHR, M. M.; MCNAMARA, J.; METCALFE, N. B.; MONAGHAN, P.; SPENCER, H. G.; SULTAN, S. E. Developmental plasticity and human health. **Nature**, v. 430, p. 419-21, 2004.
- BELLINGER, L.; LANGLEY-EVANS, S. C. Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, p. 413-20, 2005.
- BELLINGER, L.; LILLEY, C.; LANGLEY-EVANS, S. C. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. **Br J Nutr**, v. 92, p. 513-20, 2004.
- BEN MENACHEM-ZIDON, O.; AVITAL, A.; BEN-MENACHEM, Y.; GOSHEN, I.; KREISEL, T.; SHMUELI, E. M.; SEGAL, M.; BEN HUR, T.; YIRMIYA, R. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. **Brain Behav Immun**, v. 25, p. 1008-16, 2011.
- BLACK, R. E.; ALLEN, L. H.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; DE ONIS, M.; EZZATI, M.; MATHERS, C.; RIVERA, J. Maternal and child undernutrition: Global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, v. 371, p. 243-60, 2008.
- BONDOLFI, L.; ERMINI, F.; LONG, J. M.; INGRAM, D. K.; JUCKER, M. Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of c57bl/6 mice. **Neurobiol Aging**, v. 25, p. 333-40, 2004.
- BONINI, J. S.; DA SILVA, W. C.; BEVILAQUA, L. R.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of hippocampal pkc in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, v. 147, p. 37-45, 2007.

- BRIONES, T. L.;SUH, E.;HATTAR, H.;WADOWSKA, M. Dentate gyrus neurogenesis after cerebral ischemia and behavioral training. **Biol Res Nurs**, v. 6, p. 167-79, 2005.
- CAI, L.; GIBBS, R. B.; JOHNSON, D. A. Recognition of novel objects and their location in rats with selective cholinergic lesion of the medial septum. **Neurosci Lett**, v. 506, p. 261-5, 2012.
- CALLAHAN, H.;IKEDA-DOUGLAS, C.;HEAD, E.;COTMAN, C. W.;MILGRAM, N. W. Development of a protocol for studying object recognition memory in the dog. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 24, p. 693-707, 2000.
- CAMERON, H. A.; GLOVER, L. R. Adult neurogenesis: Beyond learning and memory. **Annu Rev Psychol**, v. 66, p. 53-81, 2015.
- CAMPBELL, L. F.; BEDI, K. S. The effects of undernutrition during early life on spatial learning. **Physiol Behav**, v. 45, p. 883-90, 1989.
- CARDOSO, A.; MARRANA, F.; ANDRADE, J. P. Caloric restriction in young rats disturbs hippocampal neurogenesis and spatial learning. **Neurobiol Learn Mem**, v. 133, p. 214-224, 2016.
- CARLIN, G.;CHAUMONTET, C.;BLACHIER, F.;BARBILLON, P.;DARCEL, N.;BLAIS, A.;DELTEIL, C.;GUILLIN, F. M.;BLAT, S.;VAN DER BEEK, E. M.;KODDE, A.;TOMÉ, D.;DAVILA, A. M. Maternal high-protein diet during pregnancy modifies rat offspring body weight and insulin signalling but not macronutrient preference in adulthood. **Nutrients**, v. 11, p. 2019.
- CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. L. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. **Annu Rev Neurosci**, v. 37, p. 243-62, 2014.
- CHRISTIE, B. R.; CAMERON, H. A. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Hippocampus**, v. 16, p. 199-207, 2006.
- COHEN, S. J.;MUNCHOW, A. H.;RIOS, L. M.;ZHANG, G.;ASGEIRSDÓTTIR, H. N.;STACKMAN, R. W. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. **Curr Biol**, v. 23, p. 1685-90, 2013.
- COHEN, S. J.; STACKMAN, R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behav Brain Res**, v. 285, p. 105-17, 2015.
- COLE, J. C.; RODGERS, R. J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, p. 473-8, 1995.
- DA SILVA, J. C.;SCORZA, F. A.;NEJM, M. B.;CAVALHEIRO, E. A.;CUKIERT, A. C-fos expression after hippocampal deep brain stimulation in normal rats. **Neuromodulation**, v. 17, p. 213-7; discussion 216-7, 2014.
- DE QUERVAIN, D.; WOLF, O. T.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoid-induced enhancement of extinction-from animal models to clinical trials. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 236, p. 183-199, 2019.
- DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nat Rev Neurosci**, v. 11, p. 339-50, 2010.
- DENNINGER, J. K.; SMITH, B. M.; KIRBY, E. D. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. **J Vis Exp**, v. p. 2018.
- DIAMOND, A. Executive functions. **Annu Rev Psychol**, v. 64, p. 135-68, 2013.
- DONG, W.;WANG, R.;MA, L. N.;XU, B. L.;ZHANG, J. S.;ZHAO, Z. W.;WANG, Y. L.;ZHANG, X. Influence of age-related learning and memory capacity of mice: Different effects of a high and low caloric diet. **Aging Clin Exp Res**, v. 28, p. 303-11, 2016.
- EICHENBAUM, H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. **Behav Brain Res**, v. 103, p. 123-33, 1999.
- EICHENBAUM, H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. **Nat Rev Neurosci**, v. 1, p. 41-50, 2000.
- EICHENBAUM, H. The hippocampus and declarative memory: Cognitive mechanisms and neural codes. **Behav Brain Res**, v. 127, p. 199-207, 2001.
- EICHENBAUM, H. Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, p. 109-20, 2004.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, p. 47-59, 1988.

- ENNACEUR, A.; MELIANI, K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Iii. Spatial vs. Non-spatial working memory. **Behav Brain Res**, v. 51, p. 83-92, 1992.
- ESTANISLAU, C.; VELOSO, A. W. N.; FILGUEIRAS, G. B.; MAIO, T. P.; DAL-CÓL, M. L. C.; CUNHA, D. C.; KLEIN, R.; CARMONA, L. F.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. **Physiol Behav**, v. 209, p. 112585, 2019.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, p. 7-19, 2010.
- FAO; IFAD; PAHO; UNICEF; WFP. **Latin america and the caribbean – regional overview of food security and nutrition 2021: Statistics and trends**. ed. Santiago: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2021. 62 p.
- FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. **The state of food security and nutrition in the world**. 2019. 239 p. (The state of the world)
- FEMI-AKINLOSOTU, O. M.; SHOKUNBI, M. T.; OLOPADE, F. E.; IGBONG, P. Deficits of learning and spatial memory are associated with increased pyknosis of pyramidal neurons of the hippocampus of adult rats with chronic hydrocephalus. **West Afr J Med**, v. Vol. 38, p. 1042-1049, 2021.
- FIETTA, P. The neurobiology of the human memory. **Theor Biol Forum**, v. 104, p. 69-87, 2011.
- FINKIELSTAIN, G. P.; LUI, J. C.; BARON, J. Catch-up growth: Cellular and molecular mechanisms. **World Rev Nutr Diet**, v. 106, p. 100-4, 2013.
- FONTÁN-LOZANO, A.; LÓPEZ-LLUCH, G.; DELGADO-GARCÍA, J. M.; NAVAS, P.; CARRIÓN, A. M. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. **Mol Neurobiol**, v. 38, p. 167-77, 2008.
- FRIEDMAN, N. P.; MIYAKE, A. Unity and diversity of executive functions: Individual differences as a window on cognitive structure. **Cortex**, v. 86, p. 186-204, 2017.
- FUKUDA, M. T.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the morris water maze. **Behav Brain Res**, v. 133, p. 271-7, 2002.
- GALLER, J. R.; RAMSEY, F. A follow-up study of the influence of early malnutrition on development: Behavior at home and at school. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 28, p. 254-61, 1989.
- GALLO, F. T.; KATCHE, C.; MORICI, J. F.; MEDINA, J. H.; WEISSTAUB, N. V. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-fos, egr1 and arc. **Front Behav Neurosci**, v. 12, p. 79, 2018.
- GARG, M.; THAMOTHARAN, M.; DAI, Y.; THAMOTHARAN, S.; SHIN, B. C.; STOUT, D.; DEVASKAR, S. U. Early postnatal caloric restriction protects adult male intrauterine growth-restricted offspring from obesity. **Diabetes**, v. 61, p. 1391-8, 2012.
- GARTHE, A.; ROEDER, I.; KEMPERMANN, G. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, v. 26, p. 261-71, 2016.
- GAWEL, K.; GIBULA, E.; MARSZALEK-GRABSKA, M.; FILAROWSKA, J.; KOTLINSKA, J. H. Assessment of spatial learning and memory in the barnes maze task in rodents-methodological consideration. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 392, p. 1-18, 2019.
- GIACOBBO, B. L.; DOORDUIN, J.; MORAGA-AMARO, R.; NAZARIO, L. R.; SCHILDT, A.; BROMBERG, E.; DIERCKX, R. A. J. O.; DE VRIES, E. F. J. Chronic harmine treatment has a delayed effect on mobility in control and socially defeated rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 237, p. 1595-1606, 2020.
- GIAP, B. T.; JONG, C. N.; RICKER, J. H.; CULLEN, N. K.; ZAFONTE, R. D. The hippocampus: Anatomy, pathophysiology, and regenerative capacity. **J Head Trauma Rehabil**, v. 15, p. 875-94, 2000.
- GODINHO, A. F.; DE OLIVEIRA SOUZA, A. C.; CARVALHO, C. C.; HORTA, D. F.; DE FRAIA, D.; ANSELMO, F.; CHAGURI, J. L.; FARIA, C. A. Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the gabaa receptor level, in rats. **Physiol Behav**, v. 165, p. 28-34, 2016.
- GROS, A.; VEYRAC, A.; LAROCHE, S. [brain and memory: New neurons to remember]. **Biol Aujourdhui**, v. 209, p. 229-48, 2015.
- GÜLTEKIN, F.; NAZIROĞLU, M.; SAVAŞ, H. B.; ÇİĞ, B. Calorie restriction protects against apoptosis,

- mitochondrial oxidative stress and increased calcium signaling through inhibition of trpv1 channel in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. **Metab Brain Dis**, v. 33, p. 1761-1774, 2018.
- HADEM, I. K. H.;MAJAW, T.;KHARBULI, B.;SHARMA, R. Beneficial effects of dietary restriction in aging brain. **J Chem Neuroanat**, v. 95, p. 123-133, 2019.
- HALL, J. H.;WISEMAN, F. K.;FISHER, E. M.;TYBULEWICZ, V. L.;HARWOOD, J. L.;GOOD, M. A. Tc1 mouse model of trisomy-21 dissociates properties of short- and long-term recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 130, p. 118-28, 2016.
- HARRISON, F. E.;REISERER, R. S.;TOMARKEN, A. J.;MCDONALD, M. P. Spatial and nonspatial escape strategies in the barnes maze. **Learn Mem**, v. 13, p. 809-19, 2006.
- HARRY, G. J.; LEFEBVRE D'HELLEN COURT, C. Dentate gyrus: Alterations that occur with hippocampal injury. **Neurotoxicology**, v. 24, p. 343-56, 2003.
- HATTIANGADY, B.;MISHRA, V.;KODALI, M.;SHUALI, B.;RAO, X.;SHETTY, A. K. Object location and object recognition memory impairments, motivation deficits and depression in a model of gulf war illness. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 78, 2014.
- HEGAB, I. M.;TAN, Y.;WANG, C.;YAO, B.;WANG, H.;JI, W.;SU, J. Examining object recognition and object-in-place memory in plateau zokors, eospalax baileyi. **Behav Processes**, v. 146, p. 34-41, 2018.
- HELDT, S. A.;DAVIS, M.;RATTI, E.;CORSI, M.;TRIST, D.;RESSLER, K. J. Anxiolytic-like effects of the neurokinin 1 receptor antagonist gr-205171 in the elevated plus maze and contextual fear-potentiated startle model of anxiety in gerbils. **Behav Pharmacol**, v. 20, p. 584-95, 2009.
- HERRERA, D. G.; ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 50, p. 83-107, 1996.
- HOFFMAN, G. E.; LYO, D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: Are we all 'fos-ed out'? **J Neuroendocrinol**, v. 14, p. 259-68, 2002.
- HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. C-fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Front Neuroendocrinol**, v. 14, p. 173-213, 1993.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am J Clin Pathol**, v. 75, p. 816-21, 1981.
- HSU, S. M.; SOBAN, E. Color modification of diaminobenzidine (dab) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 30, p. 1079-82, 1982.
- HUNEAU, J.-F.;MANTHA, O. L.;HERMIER, D.;MATHÉ, V.;GALMICHE, G.;MARIOTTI, F.;FOUILLET, H. Natural isotope abundances of carbon and nitrogen in tissue proteins and amino acids as biomarkers of the decreased carbohydrate oxidation and increased amino acid oxidation induced by caloric restriction under a maintained protein intake in obese rats. **Nutrients**, v. 11, p. 1087, 2019.
- INHASZ KISS, A. C.;WOODSIDE, B.;SINZATO, Y. K.;BERNARDI, M. M.;DE GRAVA KEMPINAS, W.;ANSELMO-FRANCI, J. A.;DAMASCENO, D. C. Neonatally induced mild diabetes: Influence on development, behavior and reproductive function of female wistar rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 5, p. 61, 2013.
- JACOBS, L. F.; SCHENK, F. Unpacking the cognitive map: The parallel map theory of hippocampal function. **Psychol Rev**, v. 110, p. 285-315, 2003.
- JARRARD, L. E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. **Behav Neural Biol**, v. 60, p. 9-26, 1993.
- JARRARD, L. E.; DAVIDSON, T. L.; BOWRING, B. Functional differentiation within the medial temporal lobe in the rat. **Hippocampus**, v. 14, p. 434-49, 2004.
- JESSBERGER, S.; KEMPERMANN, G. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. **Eur J Neurosci**, v. 18, p. 2707-12, 2003.
- KAPOOR, A.;DUNN, E.;KOSTAKI, A.;ANDREWS, M. H.;MATTHEWS, S. G. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: Prenatal stress and glucocorticoids. **J Physiol**, v. 572,

- p. 31-44, 2006.
- KAPTAN, Z.; AKGÜN-DAR, K.; KAPUCU, A.; DEDEAKAYOĞULLARI, H.; BATU, Ş.; ÜZÜM, G. Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex bdnf level, expression of neuron and cell proliferation in dentate gyrus. **Brain Res**, v. 1618, p. 194-204, 2015.
- KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol**, v. 25, p. R1116-21, 2015.
- KNOWLTON, B. J.; SHAPIRO, M. L.; OLTON, D. S. Hippocampal seizures disrupt working memory performance but not reference memory acquisition. **Behav Neurosci**, v. 103, p. 1144-7, 1989.
- KOVÁCS, K. J. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. **J Neuroendocrinol**, v. 20, p. 665-72, 2008.
- KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. **Methods Mol Biol**, v. 1916, p. 69-74, 2019.
- KUHLA, A.; LANGE, S.; HOLZMANN, C.; MAASS, F.; PETERSEN, J.; VOLLMAR, B.; WREE, A. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. **PLoS One**, v. 8, p. e68778, 2013.
- KULKARNI, S. K.; SHARMA, K. Alprazolam modifies animal behaviour on elevated plus-maze. **Indian J Exp Biol**, v. 31, p. 908-11, 1993.
- KUNIISHI, H.; ICHISAKA, S.; YAMAMOTO, M.; IKUBO, N.; MATSUDA, S.; FUTORA, E.; HARADA, R.; ISHIHARA, K.; HATA, Y. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. **Neurosci Res**, v. 123, p. 27-35, 2017.
- LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; HAELEWYN, B.; BOULOQUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P.; FRERET, T. Object recognition test in mice. **Nat Protoc**, v. 8, p. 2531-7, 2013.
- LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **J Vis Exp**, v. p. 2017.
- MARKEL, A. L.; GALAKTIONOV YUK; EFIMOV, V. M. Factor analysis of rat behavior in an open field test. **Neurosci Behav Physiol**, v. 19, p. 279-86, 1989.
- MARTI-NICOLOVIUS, M.; AREVALO-GARCIA, R. [caloric restriction and memory during aging]. **Rev Neurol**, v. 66, p. 415-422, 2018.
- MATOS, R. J.; OROZCO-SOLÍS, R.; LOPES DE SOUZA, S.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; BOLAÑOS-JIMÉNEZ, F. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. **Neuroscience**, v. 196, p. 16-24, 2011.
- MATTSON, M. P.; DUAN, W.; GUO, Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: Cellular and molecular mechanisms. **J Neurochem**, v. 84, p. 417-31, 2003.
- MCARDLE, H. J.; ANDERSEN, H. S.; JONES, H.; GAMBLING, L. Fetal programming: Causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats -- a review. **Placenta**, v. 27 Suppl A, p. S56-60, 2006.
- MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MUHLHAUSLER, B. S. Early origins of obesity: Programming the appetite regulatory system. **J Physiol**, v. 565, p. 9-17, 2005.
- MCMULLEN, S.; MOSTYN, A. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. **Proc Nutr Soc**, v. 68, p. 306-20, 2009.
- MENDEZ, M.; ARIAS, N.; UCEDA, S.; ARIAS, J. L. C-fos expression correlates with performance on novel object and novel place recognition tests. **Brain Res Bull**, v. 117, p. 16-23, 2015.
- MILLER, C. K.; HALBING, A. A.; PATISAUL, H. B.; MEITZEN, J. Interactions of the estrous cycle, novelty, and light on female and male rat open field locomotor and anxiety-related behaviors. **Physiol Behav**, v. 228, p. 113203, 2021.
- MILLER, S. M.; SAHAY, A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. **Nat Neurosci**, v. 22, p. 1565-1575, 2019.
- MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, p. 403-11, 2014.
- MORGAN, A. H.; ANDREWS, Z. B.; DAVIES, J. S. Less is more: Caloric regulation of neurogenesis and adult brain function. **J Neuroendocrinol**, v. 29, p. 2017.

- MOSER, M. B.; ROWLAND, D. C.; MOSER, E. I. Place cells, grid cells, and memory. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, p. a021808, 2015.
- NEVES, G.; COOKE, S. F.; BLISS, T. V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, p. 65-75, 2008.
- O'REGAN, H. J.; CHENERY, C.; LAMB, A. L.; STEVENS, R. E.; ROOK, L.; ELTON, S. Modern macaque dietary heterogeneity assessed using stable isotope analysis of hair and bone. **J Hum Evol**, v. 55, p. 617-26, 2008.
- OLTON, D. S.; FEUSTLE, W. A. Hippocampal function required for nonspatial working memory. **Exp Brain Res**, v. 41, p. 380-9, 1981.
- OLTON, D. S.; PAPAS, B. C. Spatial memory and hippocampal function. **Neuropsychologia**, v. 17, p. 669-82, 1979.
- ONG, Z. Y.; MUHLHAUSLER, B. S. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. **FASEB J**, v. 25, p. 2167-79, 2011.
- OPITZ, B. Memory function and the hippocampus. **Front Neurol Neurosci**, v. 34, p. 51-9, 2014.
- OZANNE, S. E. Metabolic programming in animals. **Br Med Bull**, v. 60, p. 143-52, 2001.
- PALOU, M.; PRIEGO, T.; SANCHEZ, J.; TORRENS, J. M.; PALOU, A.; PICO, C. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. **Endocrinology**, v. 151, p. 1030-41, 2010.
- PARIKH, I.; GUO, J.; CHUANG, K. H.; ZHONG, Y.; REMPE, R. G.; HOFFMAN, J. D.; ARMSTRONG, R.; BAUER, B.; HARTZ, A. M.; LIN, A. L. Caloric restriction preserves memory and reduces anxiety of aging mice with early enhancement of neurovascular functions. **Aging (Albany NY)**, v. 8, p. 2814-2826, 2016.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams**. 5th ed. San Diego: Academic Press. 2005
- PÉREZ-GARCÍA, G.; GUZMÁN-QUEVEDO, O.; DA SILVA ARAGÃO, R.; BOLAÑOS-JIMÉNEZ, F. Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. **Sci Rep**, v. 6, p. 21275, 2016.
- PETZKE, K. J.; FULLER, B. T.; METGES, C. C. Advances in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, p. 532-40, 2010.
- PICO, C.; PALOU, M.; PRIEGO, T.; SANCHEZ, J.; PALOU, A. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: Different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. **Front Physiol**, v. 3, p. 436, 2012.
- POULOSE, S. M.; MILLER, M. G.; SCOTT, T.; SHUKITT-HALE, B. Nutritional factors affecting adult neurogenesis and cognitive function. **Adv Nutr**, v. 8, p. 804-811, 2017.
- POWROZEK, T. A.; SARI, Y.; SINGH, R. P.; ZHOU, F. C. Neurotransmitters and substances of abuse: Effects on adult neurogenesis. **Curr Neurovasc Res**, v. 1, p. 251-60, 2004.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, p. 3-33, 2003.
- RIOUX, È.; PELLETIER, F.; ST-LAURENT, M.-H. Influence of lipids on stable isotope ratios in mammal hair: Highlighting the importance of validation. **Ecosphere**, v. 10, p. e02723, 2019.
- ROBERTSON, L. T. Memory and the brain. **J Dent Educ**, v. 66, p. 30-42, 2002.
- ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 423-33, 2009.
- ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Memory modulation. **Behav Neurosci**, v. 125, p. 797-824, 2011.
- ROSEBOOM, T. J. Epidemiological evidence for the developmental origins of health and disease: Effects of prenatal undernutrition in humans. **J Endocrinol**, v. 242, p. T135-T144, 2019.
- ROSEBOOM, T. J.; VAN DER MEULEN, J. H.; RAVELLI, A. C.; OSMOND, C.; BARKER, D. J.; BLEKER, O. P. Effects of prenatal exposure to the dutch famine on adult disease in later life: An overview. **Mol Cell Endocrinol**, v. 185, p. 93-8, 2001.

- ROSENFELD, C. S.; FERGUSON, S. A. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. **J Vis Exp**, v. p. e51194, 2014.
- RUBY, N. F.; FISHER, N.; PATTON, D. F.; PAUL, M. J.; FERNANDEZ, F.; HELLER, H. C. Scheduled feeding restores memory and modulates c-fos expression in the suprachiasmatic nucleus and septohippocampal complex. **Sci Rep**, v. 7, p. 6755, 2017.
- SAYIN, A.; DERİNÖZ, O.; YÜKSEL, N.; ŞAHİN, S.; BOLAY, H. The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 180-7, 2014.
- SCHALLERT, T.; LEASURE, J. L.; KOLB, B. Experience-associated structural events, subependymal cellular proliferative activity, and functional recovery after injury to the central nervous system. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 20, p. 1513-28, 2000.
- SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Combination of open field and elevated plus-maze: A suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 22, p. 1197-215, 1998.
- SCLAFANI, A. Psychobiology of food preferences. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25 Suppl 5, p. S13-6, 2001.
- SNYDER, J. S. Recalibrating the relevance of adult neurogenesis. **Trends Neurosci**, v. 42, p. 164-178, 2019.
- OLON-BIET, S. M.; MCMAHON, A. C.; BALLARD, J. W.; RUOHONEN, K.; WU, L. E.; COGGER, V. C.; WARREN, A.; HUANG, X.; PICHAUD, N.; MELVIN, R. G.; GOKARN, R.; KHALIL, M.; TURNER, N.; COONEY, G. J.; SINCLAIR, D. A.; RAUBENHEIMER, D.; LE COUTEUR, D. G.; SIMPSON, S. J. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. **Cell Metab**, v. 19, p. 418-30, 2014.
- OLON-BIET, S. M.; MITCHELL, S. J.; COOGAN, S. C.; COGGER, V. C.; GOKARN, R.; MCMAHON, A. C.; RAUBENHEIMER, D.; DE CABO, R.; SIMPSON, S. J.; LE COUTEUR, D. G. Dietary protein to carbohydrate ratio and caloric restriction: Comparing metabolic outcomes in mice. **Cell Rep**, v. 11, p. 1529-34, 2015.
- SPEAKMAN, J. R.; MITCHELL, S. E.; MAZIDI, M. Calories or protein? The effect of dietary restriction on lifespan in rodents is explained by calories alone. **Exp Gerontol**, v. 86, p. 28-38, 2016.
- SPIERS, H. J.; MAGUIRE, E. A.; BURGESS, N. Hippocampal amnesia. **Neurocase**, v. 7, p. 357-82, 2001.
- SPRENGELL, M.; KUBERA, B.; PETERS, A. Brain more resistant to energy restriction than body: A systematic review. **Front Neurosci**, v. 15, p. 639617, 2021.
- SQUIRE, L. R. Memory and brain systems: 1969-2009. **J Neurosci**, v. 29, p. 12711-6, 2009.
- SQUIRE, L. R.; DEDE, A. J. Conscious and unconscious memory systems. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, p. a021667, 2015.
- SQUIRE, L. R.; GENZEL, L.; WIXTED, J. T.; MORRIS, R. G. Memory consolidation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, p. a021766, 2015.
- SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T. The cognitive neuroscience of human memory since h.M. **Annu Rev Neurosci**, v. 34, p. 259-88, 2011.
- STURMAN, O.; GERMAIN, P. L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: A context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v. 21, p. 443-452, 2018.
- TANIMIZU, T.; KONO, K.; KIDA, S. Brain networks activated to form object recognition memory. **Brain Res Bull**, v. 141, p. 27-34, 2018.
- TODA, T.; PARYLAK, S. L.; LINKER, S. B.; GAGE, F. H. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. **Mol Psychiatry**, v. 24, p. 67-87, 2019.
- TONKISS, J.; GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. **Behav Brain Res**, v. 40, p. 95-107, 1990.
- TREVIÑO, S.; AGUILAR-ALONSO, P.; FLORES HERNANDEZ, J. A.; BRAMBILA, E.; GUEVARA, J.; FLORES, G.; LOPEZ-LOPEZ, G.; MUÑOZ-ARENAS, G.; MORALES-MEDINA, J. C.; TOXQUI, V.; VENEGAS, B.; DIAZ, A. A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. **Synapse**, v. 69, p. 421-33, 2015.
- TURGUT, Y. B.; TURGUT, M. A mysterious term hippocampus involved in learning and memory. **Childs**

- Nerv Syst**, v. 27, p. 2023-5, 2011.
- VADODARIA, K. C.; JESSBERGER, S. Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: Signal convergence onto small rho gtpases. **Front Synaptic Neurosci**, v. 5, p. 4, 2013.
- VAN GRONIGEN CASE, G.;STOREY, K. M.;PARMELEY, L. E.;SCHULZ, L. C. Effects of maternal nutrient restriction during the periconceptual period on placental development in the mouse. **PLoS One**, v. 16, p. e0244971, 2021.
- VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, p. 266-70, 1999.
- VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. **Curr Protoc Neurosci**, v. 69, p. 8.31.1-17, 2014.
- VOHR, B. R.;POGGI DAVIS, E.;WANKE, C. A.;KREBS, N. F. Neurodevelopment: The impact of nutrition and inflammation during preconception and pregnancy in low-resource settings. **Pediatrics**, v. 139, p. S38-S49, 2017.
- VUCETIC, Z.;TOTOKI, K.;SCHOCH, H.;WHITAKER, K. W.;HILL-SMITH, T.;LUCKI, I.;REYES, T. M. Early life protein restriction alters dopamine circuitry. **Neuroscience**, v. 168, p. 359-70, 2010.
- WADHWA, P. D.;BUSS, C.;ENTRINGER, S.;SWANSON, J. M. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Semin Reprod Med**, v. 27, p. 358-68, 2009.
- WARD, N. S. Neural plasticity and recovery of function. **Prog Brain Res**, v. 150, p. 527-35, 2005.
- WESTBROOK, S. R.; BRENNAN, L. E.; STANTON, M. E. Ontogeny of object versus location recognition in the rat: Acquisition and retention effects. **Dev Psychobiol**, v. 56, p. 1492-506, 2014.
- WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. **Toxicol Pathol**, v. 36, p. 375-84, 2008.
- WITTER, M. P.; AMARAL, D. G. Chapter 21 - hippocampal formation - paxinos, george. In: (Ed.). **The rat nervous system (third edition)**ed. Burlington: Academic Press, 2004. p.635 - 704
- WORLD HEALTH ORGANIZATION Malnutrition is an impediment to the progress (who reference number: Who/nmh/nhd/14.1). **World Health Organization**, v. p. 22, 2014.
- WURTMAN, J. J.; MILLER, S. A. Effect of litter size on weight gain in rats. **J Nutr**, v. 106, p. 697-701, 1976.
- YAGI, S.; GALEA, L. A. M. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, p. 200-213, 2019.
- YAO, B.;CHRISTIAN, K. M.;HE, C.;JIN, P.;MING, G. L.;SONG, H. Epigenetic mechanisms in neurogenesis. **Nat Rev Neurosci**, v. 17, p. 537-49, 2016.
- ZELTSER, L. M. Feeding circuit development and early-life influences on future feeding behaviour. **Nat Rev Neurosci**, v. 19, p. 302-316, 2018.

ANEXO 1 – INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DA RAÇÃO

Níveis de Garantia

Umidade (máx)	130,00 g/kg
Proteína bruta (mín)	230,00 g/kg
Extrato etéreo (mín)	40,00 g/kg
Fibra bruta (máx)	50,00 g/kg
Matéria mineral (máx)	100,00 g/kg
Cálcio (mín)	12,00 g/kg
Cálcio (máx)	13,00 g/kg
Fósforo (mín)	8.500,00 mg/kg
Sódio (mín)	2.700,00 mg/kg
Magnésio (mín)	500,00 mg/kg
Ferro (mín)	180,00 mg/kg
Cobre (mín)	30,00 mg/kg
Manganês (mín)	110,00 mg/kg
Zinco (mín)	110,00 mg/kg
Iodo (mín)	1,00 mg/kg
Cobalto (mín)	2,00 mg/kg
Selênio (mín)	0,20 mg/kg
Vitamina A (mín)	25.500,00 UI/kg
Vitamina D3 (mín)	4.000,00 UI/kg
Vitamina E (mín)	82,00 UI/kg
Vitamina K3 (mín)	6,40 mg/kg
Vitamina B1 (mín)	11,00 mg/kg
Vitamina B2 (mín)	12,00 mg/kg
Niacina (mín)	219,00 mg/kg
Ácido pantotênico (mín)	90,00 mg/kg
Vitamina B6 (mín)	11,00 mg/kg
Ácido fólico (mín)	13,00 mg/kg
Biotina (mín)	0,10 mg/kg
Vitamina B12 (mín)	40,00 mcg/kg
Olina (mín)	1.800,00 mg/kg
Lisina (mín)	12,50 g/kg
Metionina (mín)	3.500,00 mg/kg

Composição Básica

Farelo de soja*, milho integral moído, dextrina, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de soja refinado*, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), óxido de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ácido propiônico. Espécies doadoras do gene:

**Agrobacterium tumefaciens* e/ou *Arabidopsis thaliana* e/ou *Bacillus thuringiensis* e/ou *Streptomyces viridochromogenes* e/ou *Zea mays*.