

ELIZABETHE CRISTINA BORSONELO

**EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE E DA GORDURA DE
COCO ASSOCIADA AO ESTRESSE PRÉ-NATAL
SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E A
RESPOSTA COMPORTAMENTAL E DE
CORTICOSTERONA DA PROLE NA IDADE ADULTA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Fernandes Galduróz

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Deborah Suchecki

SÃO PAULO

2010

Borsonelo, Elizabethe Cristina

Efeito do óleo de peixe e da gordura de coco associada ao estresse pré-natal sobre o desenvolvimento pós-natal e a resposta comportamental e de corticosterona da prole na idade adulta/ Elizabethe Cristina Borsonelo.-- São Paulo, 2010.

xiii, 87p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Effect of fish oil and coconut fat associated to prenatal stress on postnatal development and the behavioral response and of corticosterone of the offspring in the adulthood.

1.depressão. 2.estresse pré-natal. 3.ratos. 4.lipídios.
5.corticosterona

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Maria Lúcia Oliveira de Souza Formigoni
Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

**“Não sejas o de hoje.
Não suspires por ontem...
não queiras ser o de amanhã.
Faze-te sem limites no tempo.
Vê a tua vida em todas as origens.
Em todas as existências.
Em todas as mortes.
E sabes que serás assim para sempre.
Não queiras marcar a tua passagem.
Ela prossegue:
É a passagem que se continua.
É a tua eternidade.
És tu”.**

Cecília Meireles

Dedicatória

Ao meu marido, Fernando, meu anjo da guarda. Só posso agradecer a presença constante e o companheirismo em todos os momentos da minha vida. Se isso não for amor, pois *Machado de Assis* escreveu: "*A perfeição no amor consiste no sacrifício dos desejos do amante, que anela só agradar ao objeto amado.*".

Aos meus pais, Eva e Antonio, meus avós, Angelo e Nair, e a Elisângela, minha irmã.
Este trabalho significa toda a fé, coragem e confiança em mim depositados e sem isso
não teria ido tão longe.

*"..Mire, veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão
sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando.*

Afinam ou desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou..."

João Guimarães Rosa

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e Tecnológico e Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) que viabilizaram financeiramente este trabalho.

Agradecimentos especiais

A Deus, *“pois tudo posso naquele que me fortalece”* (Fl 4:13).

Às amigas, Rosana, Claudia, Luciane, alguém escreveu um dia que *“Amigo não é aquele que está sempre junto. É aquele que sabe ir embora. Não é aquele que chora com você, e sim, aquele que ouve o que você diz. É aquele que entende o que você não diz. Amigo não vem. Ele está. É aquele que o avisa do perigo, mas não o impede de continuar. ... Enfim, o amigo é a única razão pela qual nós devemos continuar sempre e nunca desistir dessa deliciosa aventura que é a vida.”* Obrigada

A todos do departamento que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação que se concretiza na produção desta tese.

Nereide, Júlio e a todos da secretaria, sempre prontos a ajudar e nos socorrer com a burocracia.

Cristina, da biblioteca, sempre pronta para resolver os diversos e inesperados problemas.

Ao Vinícius que sempre esteve presente e pronto a por a mão na massa, ops, nos ratos.

Ao Departamento de Fisiologia Endócrina, pelo auxílio na preparação das dietas, dicas valiosas e disponibilidade.

À Deborah pela colaboração e amizade, segundo Fernando Pessoa *“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”*.

À Profa. Helena meu muito obrigada por tudo, pela sua participação na minha formação, pois

“Uns são homens; Alguns são professores;

Poucos são mestres.

Aos primeiros, escuta-se;

Aos segundos, respeita-se;

Aos últimos, segue-se.

Se hoje enxergo longe, é porque fui colocado em ombros de gigantes!”(desconhecido)

Ao meu orientador, e posso dizer meu amigo, Dr. José Carlos, pela oportunidade e confiança. *“Como poderia sentir-me infeliz se tenho ao meu redor ouvidos que escutam minhas lamúrias, lábios que dizem palavras de conforto, mãos que seguram minhas mãos, ombros que me permitem chorar! Obrigado, Senhor, por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas como você!”*

E ainda, posso dizer que *“O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira.”* (William Arthur Ward).

Mensagem final

“Dai-me, Senhor, a perseverança da ondas do mar, que fazem de cada recuo um ponto de partida para um novo avanço.” Cecília Meireles

SUMÁRIO

Dedicatória.....	5
Agradecimentos.....	7
Agradecimentos especiais.....	8
Resumo.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
O estresse e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).....	15
Depressão.....	16
O estresse pré-natal e suas conseqüências	19
Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e sua importância para o desenvolvimento corporal.....	26
OBJETIVO.....	32
MATERIAIS E MÉTODO.....	34
Animais.....	35
Suplementação com PUFA n-3.....	35
Estresse durante a prenhez.....	37
Protocolo experimental.....	39
Medidas do desenvolvimento pós-natal da prole.....	39
Equipamentos.....	40
Aparelho para o Teste da Nataçã Forçada.....	40
Campo Aberto.....	40
Coleta de sangue	41
Dosagem de corticosterona.....	41
Glândulas adrenais.....	42
Procedimento.....	42
Teste da Nataçã Forçada.....	42
Campo Aberto.....	42
Análise dos dados.....	43
RESULTADOS.....	44
I - Peso corporal durante a prenhez e amamentação, consumo de ração durante a amamentação, tamanho da ninhada e concentração de corticosterona materna.....	45
II – Avaliação do desenvolvimento pós-natal de machos.....	51

III - Avaliação do desenvolvimento pós-natal de fêmeas.....	57
IV - Avaliação comportamental de macho adulto.....	62
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
Abstract.....	99

Resumo

Tem-se proposto que o estresse pré-natal (EPN) estaria associado com o prejuízo no desenvolvimento social e comportamental da prole. Fatores nutricionais durante a prenhez e lactação também podem influenciar o desenvolvimento fetal e pós-natal. Este estudo avaliou o desenvolvimento pós-natal de filhotes expostos ao EPN e à suplementação com óleo de peixe e gordura de coco *in utero* e durante a lactação. Ratas Wistar foram distribuídas em três grupos: dieta regular, dieta suplementada com gordura de coco ou com óleo de peixe. Constatada a prenhez, foram subdivididas em dois grupos: controle (CLT) e EPN. O estresse de restrição foi aplicado entre o 14^o e 20^o dias de prenhez e a suplementação, mantida durante a prenhez e lactação. O desenvolvimento dos filhotes foi avaliado pelo peso corporal, reflexo postural, abertura dos olhos e a ambulação entre o 1^o e 21^o dias de vida. As concentrações de corticosterona materna foram determinadas durante o procedimento de estresse: 2 dias antes do EPN (basal) e imediatamente após o EPN nos dias 14 e 21 de prenhez. O comportamento tipo-depressivo no teste da natação forçada e as concentrações de corticosterona foram medidos em machos adultos expostos ao EPN. O ganho de peso das mães foi prejudicado pelo EPN, sendo que as concentrações de corticosterona estavam aumentadas no grupo EPN em relação ao grupo controle. Ao nascer, as proles do grupo EPN apresentaram menor peso, sendo que este efeito foi mantido até o desmame e prevenido pelas dietas de coco e peixe. A dieta de coco reduziu a latência para o reflexo postural de fêmeas no 1^o dia de vida em relação aos outros grupos e em machos, a dieta de peixe prejudicou este comportamento comparado com a dieta regular. Em relação à ambulação, o EPN aumentou a ambulação em machos e fêmeas, sendo que este efeito foi prevenido pela dieta de peixe em fêmeas. Na idade adulta, o EPN causou redução no peso de machos adultos quando comparado ao de animais controle. Quando os animais foram avaliados no teste da natação forçada, encontrou-se redução significativa no tempo de imobilidade em machos adultos EPN quando comparados aos controles, sugerindo um efeito tipo anti-depressivo. A atividade motora foi avaliada no campo aberto sendo que os animais não apresentaram mudanças na ambulação. Em relação às concentrações plasmáticas de corticosterona, nossos resultados mostraram que imediatamente após o teste, os machos do grupo EPN-dieta regular apresentaram menor liberação de corticosterona quando comparados com os controles. As dietas de peixe e coco também reduziram a

concentração de corticosterona em machos controles em relação ao grupo controle-dieta regular. Em conclusão, o desenvolvimento pós-natal, do nascimento até idade adulta, foi influenciado pelo EPN e pelas dietas oferecidas. Algumas das alterações resultantes do EPN foram prevenidas pelas dietas de coco e peixe. Estes resultados mostram que o EPN causa conseqüências que perduram até a idade adulta. Além disso, ambas as manipulações, EPN e as dietas, influenciaram a liberação de corticosterona na idade adulta.

“Todo conhecimento começa num sonho. O conhecimento nada mais é que a aventura pelo mar desconhecido, em busca da terra sonhada. Mas sonhar é coisa que não ensina. Brota das profundezas da terra. Como mestre só posso então lhe dizer uma coisa: Conte-me seus sonhos para que sonhemos juntos”.

Rubem Alves

INTRODUÇÃO

O estresse e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)

A habilidade de um organismo de se adaptar ao ambiente é de fundamental importância para a sobrevivência (McEwen, 1999). A vida existe por causa da manutenção de um complexo equilíbrio dinâmico interno do organismo, denominado homeostase que é constantemente desafiado por estressores (Habib, Gold, Chrousos, 2001). Selye (1949) definiu estresse como uma ameaça real ou percebida ao estado de homeostase. Mais recentemente, a resposta ao estresse tem sido referida como alostase, significando a manutenção da estabilidade por meio de mudanças (Sterling e Eyer, 1988). Esta resposta é adaptativa, transitória e termina rapidamente com o mecanismo da retroalimentação negativa. Porém, quando o estímulo estressor é incontrolável ou prolongado o organismo perde sua resistência e entra na fase de exaustão, que tem sido denominada de carga alostática, em que o organismo paga um preço muito alto pela resposta alostática ineficiente ou custo adaptativo (McEwen, 2007).

Essa resposta ao estresse é coordenada pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e pelo sistema nervoso autonômico simpático. No que diz respeito ao eixo HPA, o fator liberador de corticotrofina (CRH) é liberado do hipotálamo na circulação porta-hipofisária da eminência mediana e estimula a pituitária a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este hormônio ativa o córtex das glândulas adrenais a liberar os glicocorticóides, corticosterona (CORT) no rato ou cortisol em humanos. Os glicocorticóides ligam-se aos receptores mineralocorticoides (MR) e estes parecem estar envolvidos com a atividade basal do eixo HPA, enquanto que os receptores glicocorticóides (GR) participam da restauração do equilíbrio do organismo. A atividade do eixo HPA está envolvida com funções fisiológicas importantes como o crescimento e

a reprodução, enquanto que a hiperativação está relacionada com a supressão de alguns sistemas, tais como o reprodutivo e imunológico, além de tornar o indivíduo susceptível ao desenvolvimento de doenças (Chrousos e Gold, 1992; Vázquez, 1998; Weinstock, 2005; Maccari e Morley-Fletcher, 2007).

Depressão

Transtornos neuro-psiquiátricos afligem aproximadamente 450 milhões de indivíduos mundialmente (World Health Organization, 2001). Destes transtornos, a depressão que afeta mais mulheres do que homens, tem sido considerada um problema de saúde pública de magnitude crescente, com estimativas que apontam a depressão maior como a terceira doença mais incapacitante nos países desenvolvidos e a primeira nos países em desenvolvimento, no ano de 2020 (Murray e Lopes, 1997; World Health Organization, 2001). Os sintomas depressivos são descritos desde a antiguidade em diversos lugares e culturas, sugerindo que sua existência é universal e atemporal. A presença do humor deprimido costuma ser descrito como sentimentos de tristeza, vazio ou desesperança em 90% dos pacientes. Queixas de ansiedade, irritabilidade e preocupação também são comuns, assim como o desinteresse ou perda da capacidade de sentir prazer nas atividades habituais. Além disso, pode ocorrer sentimento de culpa e redução da auto-estima. Na maioria dos casos, as pessoas com depressão apresentam redução do apetite com perda de peso e alterações no sono como insônia terminal, despertando horas antes do necessário. A perda de energia, cansaço e fadiga excessiva estão presentes em praticamente todas as pessoas com depressão assim como a indecisão, perda da capacidade de concentração e esquecimentos (Justo et al., 2007).

Desde a antiguidade, busca-se compreender os mecanismos envolvidos na psicopatologia dos transtornos de humor. Considerando suas bases biológicas, muitos estudos identificaram mudanças neuroendócrinas, neuroquímicas e neuroanatômicas em pacientes com depressão maior (Heim, Plotsky, Nemeroff, 2004). Muitas destas alterações afetam circuitos neuronais envolvidos na modulação da emoção e da resposta de estresse (Arborelius et al., 1999). Episódios de depressão na idade adulta são freqüentemente exacerbados pelo estresse prolongado, sugerindo que o estresse precoce na infância possa induzir a sensibilização a estressores subseqüentes, que em interação com outros fatores de risco predisporia os indivíduos ao desenvolvimento da depressão (Kendler et al., 1992). Alguns autores têm sugerido um modelo interacionista para explicar a relação entre estresse, alteração do eixo HPA e desenvolvimento da depressão. Neste modelo (Fig. 1), experiências adversas precoces, como o estresse na infância, poderiam induzir uma sensibilização a estressores subseqüentes que em interação com outros fatores, predisporia o individuo ao desenvolvimento da depressão na vida adulta (Agid, Kohn, Lerer, 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Plotsky, Owens e Nemeroff, 1998). Além disso, estudos epidemiológicos mostram que 40-50% do risco para desenvolver depressão é genético, embora os genes responsáveis pelo risco aumentado ainda não tenham sido identificados (Nestler et al., 2002). Assim, parece que há uma interação entre fatores ambientais e genéticos que influenciariam a vulnerabilidade à depressão em muitos pacientes (Nestler et al., 2002). Por outro lado, nem toda depressão estaria associada com estresse precoce na vida e há subgrupos importantes de depressão que poderiam ser biologicamente diferentes (van Praag, 2004).

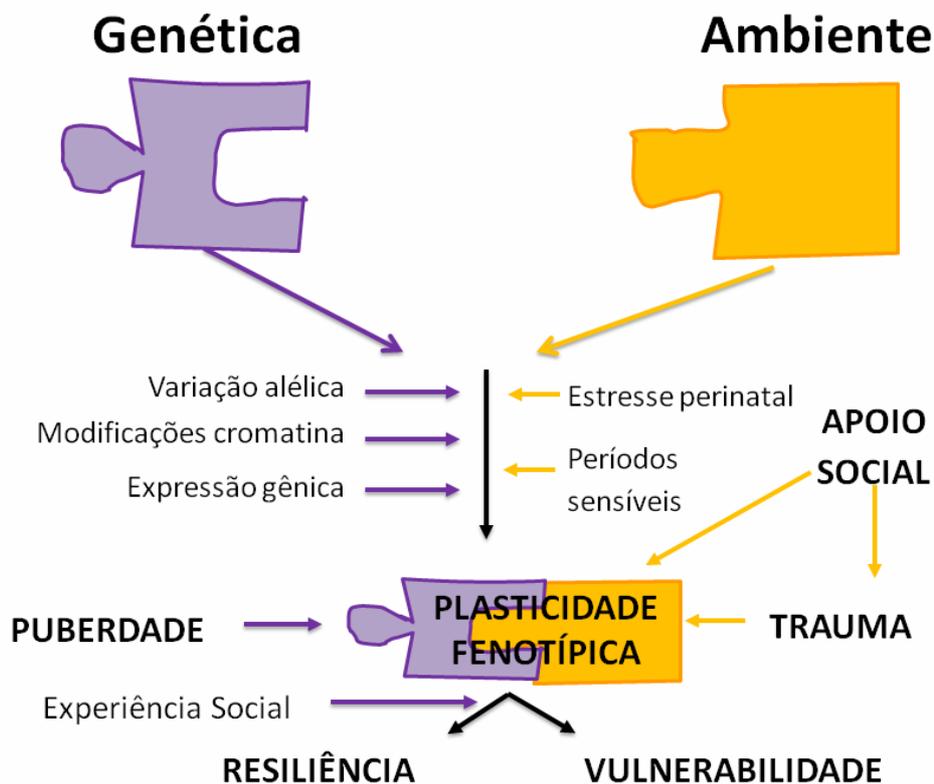


Figura 1 – Modelo da interação entre a genética e o ambiente na determinação de resiliência ou vulnerabilidade dos indivíduos às doenças desencadeadas por estresse (adaptado de Plotsky, Owens e Nemeroff, 1998).

O estresse parece estar envolvido com o desencadeamento e manutenção de doenças psiquiátricas específicas. Por exemplo, estressores psicossociais estariam temporariamente e talvez causalmente, associados com o início de episódios depressivos e também de sintomas ansiosos (Post, 1992; Brown, 1993; Breslau et al., 1997). A hiperatividade do eixo HPA é um dos resultados mais consistentes em pacientes com depressão maior desde a década de 50, sendo que aproximadamente metade destes apresenta hipersecreção de cortisol (Nestler et al., 2002; Pariante, 2006). Estas alterações são revertidas pelo tratamento com medicamento antidepressivo (Holsboer, 2001).

O estresse pré-natal e suas conseqüências

O efeito do estresse durante a prenhez tem sido de grande interesse devido às suas conseqüências sobre o desenvolvimento da prole em relação ao comportamento, morfologia, fisiologia e resposta imunológica (Weinstock, 2001). Há diversas evidências de que variações no ambiente pré-natal podem influenciar as respostas dos indivíduos na idade adulta. Especula-se que a plasticidade pré-natal dos sistemas fisiológicos permite que fatores ambientais, agindo sobre a mãe e/ou sobre o feto, alterem a diferenciação de um órgão, tecido ou sistema de modo a preparar adequadamente o feto para as condições ambientais extra-útero (Weinstock, 2001; Maccari et al., 2003). Porém, condições extremas como estresse intenso e/ou desnutrição, poderiam aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento de anormalidades fisiológicas e comportamentais de curta ou longa duração na prole, como por exemplo, peso reduzido ao nascer, aumento da morbidade infantil, retardo na locomoção e cognição (Schell, 1981; Meier, 1985; Lesage et al., 2004; Weinstock 2005). Em humanos, o atraso no crescimento intra-uterino e redução do peso ao nascer são considerados índices de estresse pré-natal e estes resultados têm gerado a hipótese da origem fetal das doenças cardiovasculares (Barker, 1995). Essa hipótese da origem fetal das doenças cardiovasculares ou conceito de programação fisiológica precoce explicaria a associação entre eventos ambientais pré-natais e o desenvolvimento e crescimento fetais alterados e a fisiopatologia tardia, refletindo a ação de fatores durante um período ou janela sensível do desenvolvimento em afetar a organização de tecidos específicos que estão vulneráveis, produzindo efeitos que persistem ao longo da vida (Barker, 1995; Seckl e Meaney, 2004).

Tem se aventado a hipótese de que os glicocorticóides de origem materna seriam responsáveis pela correlação entre o baixo peso ao nascer e transtornos neuroendócrinos, metabólicos e cardiovasculares como a hipertensão, diabetes tipo 2, doença coronariana isquêmica e outras doenças na idade adulta (Seckl, 1998). A redução é mais crítica quando a administração é feita em estágios tardios da gestação, refletindo a ação catabólica deste esteróide e que se manifesta no peso reduzido ao nascer durante um período que seria de máximo crescimento somático fetal. Esses esteróides são importantes para maturação normal de muitas regiões do sistema nervoso central em desenvolvimento, iniciando a maturação de terminais nervosos, remodelando axônios e dendritos e a sobrevivência celular (Seckl e Meaney, 2004). Desse modo, o cérebro seria muito sensível a esses fatores programadores e assim o comportamento materno e os glicocorticóides teriam uma poderosa propriedade programadora (Seckl, 1998; Huizink, Mulder, Buitelaar, 2004).

Outros estudos revelam que o feto é sensível ao ambiente materno e mostram que mulheres gestantes ansiosas, que possuem um fluxo sanguíneo alterado nas artérias uterinas, podem influenciar o desenvolvimento de seus fetos (Groome et al., 1995; Teixeira, Fisk, Glover, 1999). Resultados mostram que experiências ambientais adversas ocorridas precocemente predis põem os indivíduos a desenvolver transtornos afetivos e de ansiedade na vida adulta (Heim e Nemeroff, 1999). Por exemplo, o estresse durante a infância aumenta o risco para depressão na idade adulta, onde mulheres com história de abuso sexual ou físico na infância apresentam mais sintomas de depressão e ansiedade na idade adulta do que aquelas sem história de abuso (McCauley et al., 1997).

Em ratos, a ausência de conexões neurais entre mãe e feto indica que mudanças comportamentais e funcionais induzidas pelo EPN sejam mediadas pelos hormônios da

mãe que atravessam a placenta e atingem a circulação fetal. O ACTH e a CORT são detectados no plasma do feto e da mãe não-estressada a partir do 16º dia de prenhez em ratos (a prenhez em ratos tem duração de 21 dias), quando o eixo do feto já está ativo. Antes disso, por exemplo, no 10º dia, o ACTH plasmático aumenta na mãe enquanto que a CORT aumenta na circulação de ambos (Weinstock 2005). Foram encontradas concentrações aumentadas de CORT no plasma de ratas estressadas e de seus fetos durante o 14º e 19º dias de prenhez (Zarrow et al., 1970). Zagron e Weinstock (2006) também mostraram concentrações aumentadas de CORT nos dias 17 e 20 de prenhez. Esses autores usaram uma forma suave de estresse pré-natal durante a última semana de prenhez e verificaram déficit de aprendizagem e aumento de ansiedade na prole, sendo que este efeito foi prevenido pela adrenalectomia e reposição com CORT, indicando que os glicocorticóides contribuem significativamente para a gênese dos efeitos comportamentais de animais submetidos ao EPN. Neste estudo, as fêmeas foram mais sensíveis aos efeitos do EPN em relação à ansiedade e os machos mais prejudicados no modelo de aprendizagem. As diferenças entre os gêneros dependem da gravidade do estresse, do tempo de exposição ao estressor durante a prenhez, da quantidade de hormônio que atinge o cérebro, da taxa de desenvolvimento de sistemas neurais específicos e sua sensibilidade às concentrações circulantes de CORT (Zagron e Weinstock, 2006).

Existem algumas possibilidades para explicar o aumento de CORT no feto. Uma delas seria a transferência através da placenta, mas alguns autores relatam que o acesso ao feto seria limitado pela enzima 11 β -hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2) que converte a CORT ativa em um produto inativo (Reznikov, Nosenko, Tarasenko, 1999; Edwards et al., 1996). No entanto, animais submetidos ao EPN apresentam redução da enzima 11 β -HSD2 o que permite maior acesso da CORT ao

feto (Mairesse et al, 2007). Esse resultado em ratos confirma dados em humanos mostrando uma correlação positiva entre o cortisol materno e o fetal (Gitau et al, 1998). A outra possibilidade seria que o CRH materno cruzaria a placenta e ativaria o eixo HPA fetal diretamente, o que explicaria as concentrações aumentadas de glicocorticóides (Williams et al., 1998). Além disso, durante a gestação a placenta torna-se uma unidade endócrina transitória que pode produzir CRH e outros hormônios, sendo este CRH idêntico ao produzido pelo hipotálamo porém não está sujeito ao mecanismo de feedback negativo, ao contrário, participa de mecanismos de feedback positivo. Assim, a CORT da mãe poderia estimular a produção de CRH pela placenta e este ativaria o eixo HPA fetal (Petraglia et al., 1990; Sandman et al., 1997). A figura 2 representa os mecanismos descritos acima.

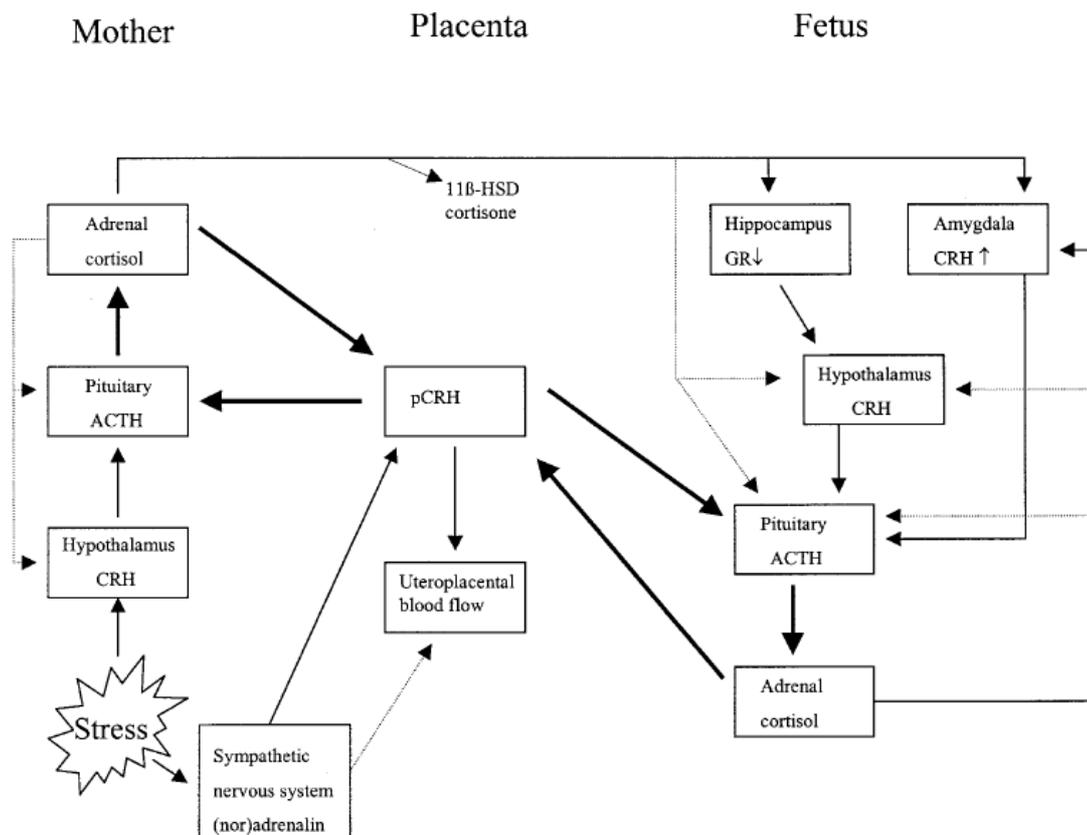


Figura 2 – Efeito do EPN sobre a regulação hormonal na mãe, placenta e feto. Linha sólida representam ativação; linha pontilhada indica efeito inibitório; em negrito mecanismo feedback positivo (Huizink, Mulder, Buitelaar, 2004).

O desenvolvimento e a maturação do eixo HPA é espécie-específico. Em primatas, o crescimento cerebral e parte do desenvolvimento neuroendócrino ocorrem antes do nascimento, mas em ratos, camundongos e coelhos tal evento ocorre após o nascimento (Weinstock, 2008, Figura 3). Ao nascer, o cérebro do rato possui cerca de 12% de seu peso quando adulto. Após o nascimento, o desenvolvimento pós-natal é rápido e o animal atinge o peso adulto em 40 dias. O desenvolvimento cerebral no rato entre os dias 12-14 é compatível com o de bebês humanos próximo ao nascimento (Huizink, Mulder, Buitelaar, 2004). Alguns estudos mostram que a elevação de CORT plasmática causada pelo EPN continua após o fim do estresse, durante o período de lactação, e este esteróide atingiria o filhote pelo leite ou poderia modificar o cuidado materno (Pfister e Muir, 1989; Darnaudery e Maccari, 2008).

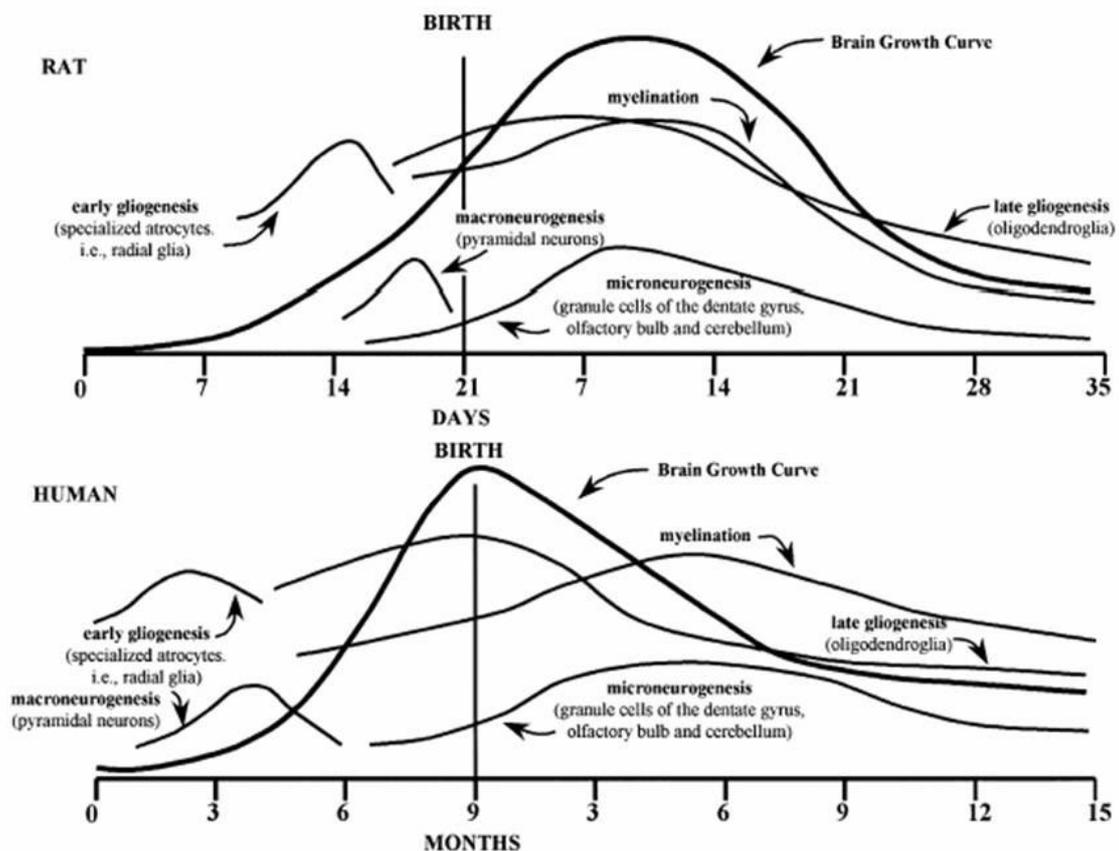


Figura 3 – Comparação do desenvolvimento encefálico de ratos e humanos (Morgane et al., 2002)

Desse modo, o EPN tem sido usado como modelo animal de depressão, especialmente porque os estudos indicam que este modelo preenche dois dos três critérios necessários para validação de modelos animais de doença psiquiátrica. A validade preditiva, capacidade do teste de prever efeito de drogas usadas na clínica, e a validade de constructo, correspondência entre os processos psicobiológicos implicados na patogenia e o comportamento do animal medido no teste, são altas, sendo anormalidades observadas no rato submetido ao EPN semelhantes às aquelas encontradas na depressão humana (Maccari et al., 2003; Maccari e Morley-Fletcher, 2007). Algumas dessas anormalidades são: prejuízo da inibição do feedback do eixo HPA (Maccari et al., 1995; Koehl et al., 1999; Morley-Fletcher et al., 2003b), que é associado ao prejuízo da neurogênese hipocampal (Lemaire et al., 2000); alteração do ciclo sono-vigília com aumento de sono REM (Dugovic, 1999), alterações de ritmos circadianos como o da secreção de CORT e da atividade locomotora (Khoel et al, 1997; 1999) e disfunção do sistema serotoninérgico cortical (Morley-Fletcher et al., 2004). Além disso, ratos estressados pré-natalmente apresentam prejuízos comportamentais como atividade sexual diminuída (Rhees et al., 1999), aumento do comportamento tipo-ansioso (Weinstock, 2001) e tempo de imobilidade aumentado no teste da natação forçada (TNF) (Morley-Fletcher et al., 2004). Segundo Weinstock (2008), os estudos com ratos e camundongos indicam que alterações são observadas na programação do eixo HPA de filhotes se o estresse materno é de intensidade suficiente e se administrado pelo menos uma vez ao dia entre o 14^o e 21^o dia de prenhez.

Porém, a essência dos sintomas da depressão clínica envolve alterações no humor que não podem ser avaliadas em animais. Entretanto, parâmetros comportamentais relacionados com a depressão em humanos como a perda do *coping*, isolamento social, falta de prazer (anedonia) podem ser mensuradas em condições

apropriadas. Por exemplo, a falta de controle sobre a situação aversiva levaria a expectativa de que o estímulo aversivo subsequente seria incontrolável e isto precipitaria um comportamento denominado de desamparo aprendido (Seligman, 1972). Similarmente, este comportamento passivo também seria observado no TNF. Neste modelo, os animais são expostos ao teste por duas vezes com intervalo de 24 horas, e na segunda exposição apresentam tempo de imobilidade aumentado porque aprendem que essa situação é inescapável (Porsolt et al., 1978).

Embora as relações entre a imobilidade observada no TNF e o comportamento tipo-depressivo não sejam claras, os estudos sugerem que haveria alguma característica comum entre a depressão em humanos e este comportamento do rato (Weinstock, 2001). O tratamento com muitas classes de antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade (Porsolt et al., 1978). Muitos estudos usando paradigmas de estresse pré-natal mostram aumento no tempo de imobilidade que pode ser revertido com o uso de antidepressivos (Alonso et al., 1991; Morley-Fletcher et al 2003b; 2004; Szymanska et al., 2009). Animais que não foram submetidos ao estresse pré-natal podem apresentar aumento no tempo de imobilidade pela infusão de CRH no locus coeruleus (Butler et al., 1990) e redução deste parâmetro após administração de metirapona ou adrenalectomia (Mitchell e Meaney, 1991; Baez e Valosin, 1994). Estes resultados sugerem que o desespero comportamental observado no TNF está associado com aumento na atividade de CRH e ativação do eixo HPA.

Segundo Weinstock (2008), resultados demonstram um possível envolvimento do estresse pré-natal na etiologia do comportamento tipo-depressivo, mas fatores genéticos também seriam importantes. Ao contrário dos resultados encontrados com ratos Sprague-Dawley e Wistar, o estresse de restrição materno três vezes ao dia não induz comportamento tipo-ansioso ou tipo-depressivo em ratos Lewis ou Fischer (Storh

et al., 1998; Van den Hove et al., 2005). Além disso, outros estudos mostram uma dissociação entre a reatividade do eixo HPA ao estresse e o comportamento (Stohr et al., 2000; Solberg et al., 2003).

Os resultados dos estudos com estresse durante a prenhez têm sido controversos e muitas dessas discrepâncias poderiam ser oriundas de diferenças nos procedimentos usados tais como o tipo de estressor, a linhagem dos animais, o período da prenhez em que o estressor foi aplicado, a fase do ciclo claro-escuro, tipo de estressor pós-natal e/ou a idade dos animais após o nascimento (Weinstock, 1997, Williams et al., 1999; Kofman, 2002). É interessante notar que algumas manipulações pós-natais como a adoção, o *handling* e o ambiente enriquecido podem neutralizar os efeitos do estresse pré-natal (Maccari et al., 1995; Secoli e Teixeira, 1998; Drago, Di Leo, Giardina, 1999; Morley-Fletcher et al., 2003a; Lemaire et al., 2006), enquanto que outras, como a administração de CORT neonatal teria efeito oposto ao do estresse pré-natal (Catalani et al., 1993, 2000; Vallée et al., 1997).

Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e sua importância para o desenvolvimento corporal

Os ácidos graxos essenciais (AGE) recebem essa denominação porque são obtidos somente pela dieta, pois o organismo animal não é capaz de sintetizá-los (Spector, 1999; Haag, 2003). O ácido linoléico (LA) ou n-6 e o ácido alfa-linolênico (ALA) ou n-3 são considerados AGE e seus metabólitos mais conhecidos são os ácidos gamalinolênico (GLA), dihomogamalinolênico (DGLA), araquidônico (AA) e ácidos eicosapentanóico (EPA), docosahexanóico (DHA), respectivamente (Figura 3). Devido à longa cadeia carbônica e ao número de insaturações esses ácidos graxos são

classificados como ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Essas duas classes de PUFAs são metabolicamente e funcionalmente distintas e possuem funções fisiológicas opostas; por exemplo, enquanto o n-3 suprime a síntese de citocinas IL-1 e IL-6 aumentando IL-2, o n-6 produz efeito oposto promovendo a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo aumento na produção de citocinas via AA (Yehuda, 2003). Além disso, são constituintes das membranas celulares determinando suas propriedades biológicas e a resposta celular a muitos estímulos (Das, 2003).

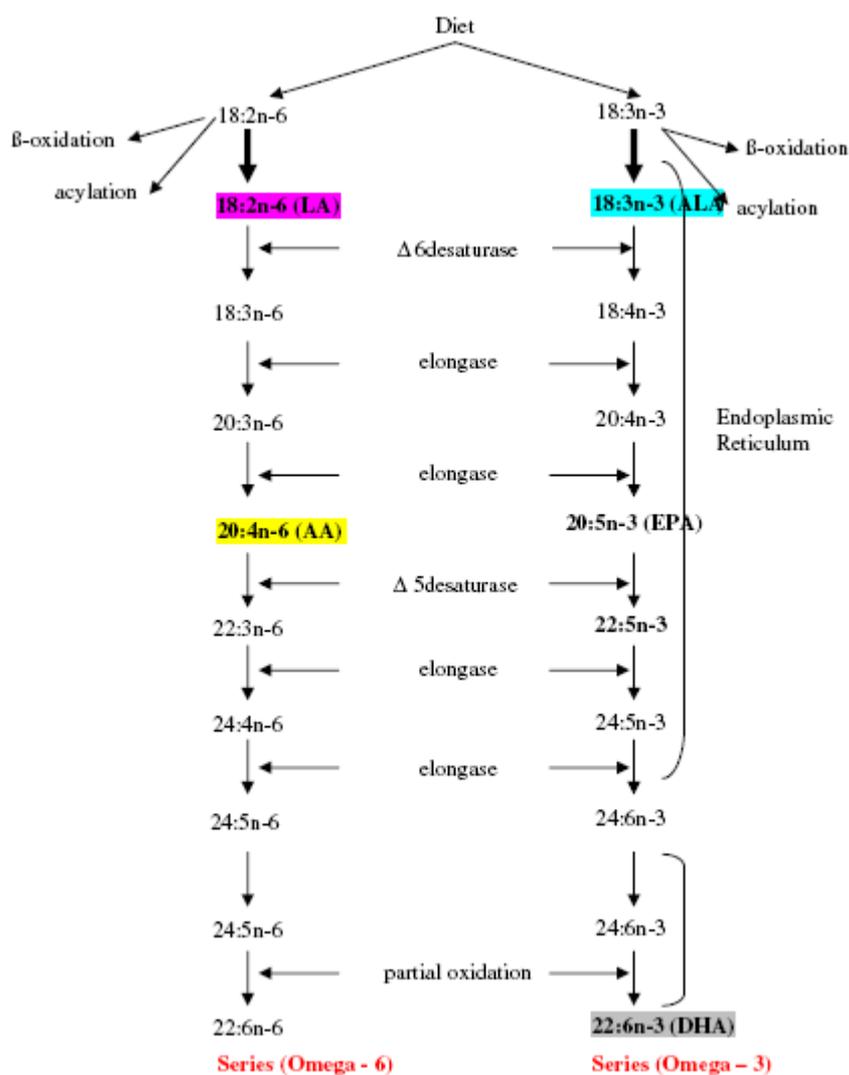


Figura 3. – Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados. Em destaque estão os precursores e seus principais metabólitos (Borsonelo e Galduróz, 2008).

Os PUFAs podem modificar a atividade da proteína cinase C, mediar a ação de fatores de crescimento, modular a resposta imunológica, influenciar a síntese de radicais livres e óxido nítrico, modificar a fluidez da membrana neuronal, modificar enzimas ligadas à atividade da membrana e seu funcionamento e de canais iônicos, o número e afinidade de receptores (Yehuda, 2003; Das, 2003). Além disso, podem reduzir as concentrações de colesterol e triglicérides, prevenir doenças coronarianas, ter ação antiinflamatória, caracterizando-se como essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais (Das, 2003).

Dietas geralmente contêm uma quantidade adequada em ALA, porém a biossíntese de DHA nem sempre é suficiente para o bom funcionamento do sistema nervoso (Uauy et al., 2000; Freeman, 2000). O principal PUFA encontrado no cérebro é o DHA e compreende cerca de 10 a 20% dos ácidos graxos totais (Marteinsdottir et al., 1998). No cérebro, DHA se acumula em sinaptossomas, astrócitos, mielina, microssoma e membranas mitocondriais (Bourre et al, 1993). Além disso, alguns estudos sugerem que esses PUFAs, especialmente o DHA, promovem a maturação neuronal e sensorial em crianças (Das, 2003); no entanto, os indivíduos podem variar em sua habilidade para sintetizá-los ou incorporá-los no cérebro e em outros tecidos (Horrobin e Benett, 1999; Youdim, 2000).

Estudos mostram que tanto a integridade como o funcionamento neuronal podem ser alterados pela deficiência em n-6 ou n-3 durante o desenvolvimento fetal e neonatal (Innis, 1994; Anderson, 1994; Fedorova e Salem, 2006; Carlson, 2009). O leite materno fornece à criança tanto DHA como AA e suas concentrações podem variar de acordo com a dieta da mãe e as mesmas não são afetadas pela quantidade de seus precursores na dieta, sugerindo que é necessário suplementar a dieta materna com PUFAs pré-formados (Ratnayake & Hollywood, 1997 *apud* Horrocks & Yeo, 1999).

Durante o desenvolvimento fetal, o DHA é transportado preferencialmente através da placenta para a circulação fetal, embora o cérebro e o fígado do feto e da criança possam produzir uma quantidade limitada de DHA que não é suficiente para o bom desenvolvimento (Salem et al., 1996; Green & Yavin, 1998).

A deposição de PUFA no sistema nervoso central (SNC) é rápida durante o crescimento cerebral pré e pós-natal e é dependente da quantidade oferecida na dieta durante a gestação e lactação (Broadhurst et al., 2002; Innis, 2008; Zeisel, 2009). No rato, as concentrações de DHA aumentam rapidamente a partir do 14^o dia de prenhez até o nascimento, para constituir 10 a 12% dos ácidos graxos totais. Após o parto, suas concentrações continuam a aumentar e atingem um platô por volta do desmame. Este aumento cortical coincide com períodos ativos de neurogênese, migração e diferenciação de neuroblastos, sinaptogênese e mielinização axonal (Green e Yavin, 1996; Green et al., 1999; Schiefermeier e Yavin, 2002). Assim, a deficiência de PUFA durante a gestação e lactação estaria relacionada com baixo peso ao nascer e alterações estruturais no cérebro culminando com o mau desenvolvimento cerebral e acuidade visual (Horrocks & Yeo, 1999; Chalon et al., 2001; Broadhurst et al., 2002; Silva et al., 2002; Takeuchi et al., 2002; Zimmer et al., 2002; Das, 2003; Walker et al., 2004).

Alguns estudos mostram que populações que ingerem uma dieta rica em PUFA apresentam uma prevalência menor de sintomas depressivos e de depressão (Hibbeln, 1998; Tanskanen et al., 2001ab). Além disso, o exame da composição sérica de PUFA em ésteres de colesterol e fosfolípidios de pacientes com depressão, mostra redução nas concentrações de omega-3 total (Maes et al., 1996,1999). Outros autores encontram redução de omega-3, particularmente DHA, na membrana de hemácias de pacientes com depressão (Edwards et al., 1998; Peet et al, 1998). A associação de

omega-3 à terapia convencional com antidepressivos produz melhora dos sintomas depressivos, especialmente, do humor deprimido, insônia e sentimento de culpa, enquanto outro estudo também mostra redução nos escores de depressão com aumento das concentrações de DHA ao final do tratamento comparado com aquelas encontradas no pré-tratamento (Peet e Horrobin, 2002; Su et al., 2003).

As concentrações de CORT também podem ser moduladas por fatores nutricionais (Tannenbaum et al., 1997; Trottier et al., 1998). Filhotes de mães alimentadas com dietas ricas em gordura apresentam redução na liberação de CORT 60 minutos após exposição ao éter no 10º dia pós-natal (Trottier et al., 1998). Porém, outro estudo mostra aumento na liberação de CORT em ratos machos alimentados com dieta rica em gordura durante 7 e 21 dias de vida (Tannenbaum et al., 1997).

Em animais, dietas contendo PUFA atenuam ou bloqueiam os efeitos comportamentais e bioquímicos causados pela administração intracerebroventricular de IL-1 em animais submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um teste de ansiedade (Song et al., 2003). Esses dados sugerem que os PUFAs parecem diminuir a resposta ao estresse, auxiliando a manutenção da integridade do eixo HPA.

Alguns estudos mostraram que a administração de PUFA n-3 durante os períodos de gestação, lactação e/ou pós-desmame, previne o efeito tipo-depressivo na idade adulta (Naliwaiko et al., 2004; Ferraz et al., 2008). Além disso, tratamento de ratos adultos com PUFA n-3 resulta em efeito tipo-antidepressivo no TNF (Carlezon et al., 2005; Huang et al., 2008; Venna et al., 2009). Uma das principais funções dos PUFAs no sistema nervoso está relacionada com o funcionamento das membranas neuronais que precisam estar num estado ótimo de fluidez para permitir a troca iônica. A composição ideal de PUFA na dieta não está totalmente estabelecida, mas tem se sugerido que a proporção 4:1 entre omega-6/omega-3 exerce efeitos benéficos para as

funções cerebrais como memória, aprendizado, cognição e humor. Assim, uma composição adequada na dieta pode melhorar o desempenho cerebral e ser de extrema importância para um bom estado geral de saúde mental (Horrocks e Yeo, 1999; Freitas e Kietzer, 2002).

OBJETIVO

Todos os resultados apresentados na introdução sugerem que tanto o estresse pré-natal como a deficiência em PUFA causariam alterações no desenvolvimento que poderiam resultar em mudanças comportamentais e neuroendócrinas associadas com transtornos mentais, especialmente a depressão.

Desse modo, considerando-se que o estresse pré-natal pode contribuir para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como a depressão, pelos efeitos deletérios causados pelos glicocorticóides, questionamos se a suplementação com PUFA durante a gestação e lactação poderia prevenir ou reduzir possíveis alterações comportamental e neuroendócrina induzidas pelo estresse pré-natal. Assim, este estudo propõe-se a investigar o efeito da suplementação com PUFA n-3 em animais estressados pré-natalmente, sobre medidas de desenvolvimento pós-natal e sobre a resposta comportamental e de CORT na idade adulta.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 42 ratas fêmeas Wistar, com 10 semanas de idade e peso médio de 281g, obtidas do Biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo, seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo **CIOMS (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, Geneva, 1985)** e após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (CEP N°. 1689/05). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (38,4 x 31,5 x 17cm) forradas com serragem, e receberam comida e água *ad libitum*. O laboratório foi mantido com controle de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e com programa de iluminação artificial (luminárias acesas às 7:00 h e apagadas às 19:00 h).

Suplementação com PUFA n-3

A suplementação com PUFA n-3 (Sigma[®], USA) e com gordura de coco foi oferecida na dieta. Foram utilizados três tipos de dieta: dieta regular, ração comercial (Nuvilab[®]); dieta suplementada com PUFA n-3, que foi preparada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/EPM, acrescida com 11% de óleo de peixe (n-3) à ração comercial (Nuvilab[®]) e ração suplementada com gordura de coco preparada de modo semelhante à dieta com óleo de peixe. Foram ajustadas as proporções de proteína e de antioxidante [butil hidrotolueno (BHT)] para equilibrar o conteúdo de proteína e controle da oxidação lipídica, respectivamente. Dessa forma, os animais foram alimentados com dietas contendo porcentagens equivalentes de gordura, diferindo somente quanto ao tipo da mesma. A gordura de coco foi escolhida porque contém uma quantidade muito baixa de ácido graxo poliinsaturado quando comparado com o óleo de peixe (Borsonelo et al., 2007).

Os animais foram divididos em três grupos [Grupo suplementado com PUFA n-3 (N=12); Grupo suplementado com gordura de coco (N=10) e Grupo não-suplementado (N=20)] e posteriormente subdivididos em dois grupos [estresse pré-natal (EPN) e controle (CTL)].

As ratas foram alimentadas com as dietas regular e suplementadas com óleo de peixe ou gordura de coco durante 15 dias (adaptação) e, então, acasaladas com machos experientes não submetidos à suplementação. A constatação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal determinou o dia zero de prenhez. Durante a prenhez e amamentação a suplementação foi mantida. Os ácidos graxos presentes nas dietas estão descritos na Tabela 1 conforme análise realizada no Laboratório Adolf Lutz.

As dietas suplementadas foram preparadas duas vezes ao mês mantidas sob refrigeração a 4 ± 2 °C.

Tabela 1 – Composição dos ácidos graxos da dieta regular e suplementadas com óleo de peixe ou gordura de coco

Ácidos graxos	Dieta regular	Dieta suplementada com gordura de coco	Dieta suplementada com óleo de peixe
Saturados			
C6:0 capríco	0,00	< 50	0,00
C8:0 caprílico	0,00	448	0,00
C10:0 cáprico	0,00	426	0,00
C12:0 láurico	0,00	5730	< 50
C14:0 mirístico	0,00	1825	880
C15:0 pentadecaenoico	0,00	0,00	70
C16:0 Palmítico	698	1642	2021
C17:0 margárico	0,00	0,00	57
C18:0 esteárico	140	395	349
C20:0 araquídico	< 50	< 50	< 50
C22:0 behênico	< 50	< 50	< 50
Monoinsaturado			
C14:1 miristoleico	0,00	0,00	< 50
C16:1 palmitoleico	0,00	0,00	992
C17:1 heptadecenóico	0,00	0,00	< 50
C18:1 cis-octadecenóico n-9	1113	2614	1395
C20:1 eicosaenóico	< 50	< 50	83
Poliinsaturado			
C18-2 linoleico n-6	2510	2150	1811
C18-3 linolênico n-3	212	148	251
C20:5 eicosapentaenóico n-3	0,00	0,00	1007
C22:6 docosahexaenóico n-3	0,00	0,00	884
Total lipídeos *	6,81	17,14	17,29

Valores estão expressos em mg/100g , * expressos em g/100g.

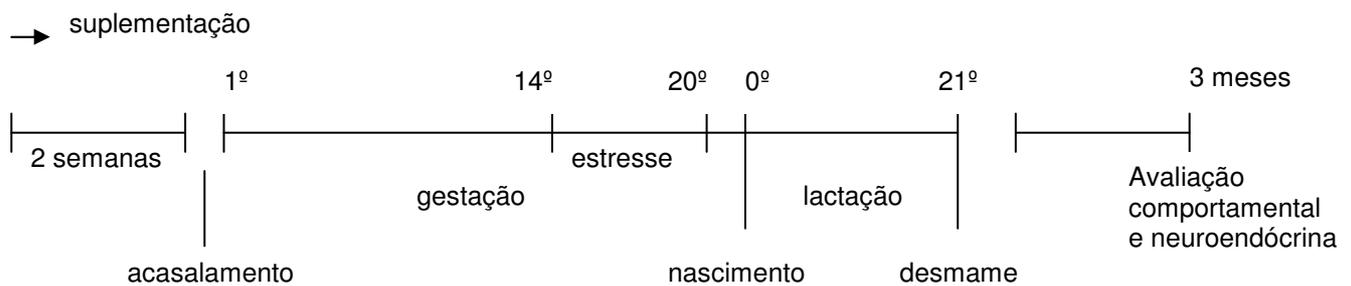
Estresse durante a prenhez

O estresse foi aplicado como previamente descrito (Ward e Weisz, 1984; Maccari et al., 1995; Barbazanges et al., 1996). Entre o 14^o e o 20^o dias de prenhez, as ratas de cada grupo (suplementado com PUFA n-3, suplementado com gordura de coco e não-suplementado) foram submetidas individualmente ao estresse de restrição em tubos de PVC (6 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento) e expostas a iluminação

intensa (duas lâmpadas fluorescentes compactas de 27 WATTS cada uma que corresponde a 135 W quando comparado com a lâmpada incandescente) durante 45 minutos, 3 vezes ao dia (09:00 h, 12:00 h e 16:00 h). Outros animais de cada grupo foram mantidos em suas gaiolas-moradias (grupo não estressado). O dia do nascimento dos filhotes foi denominado dia 0 e no dia pós-natal 1, as ninhadas foram reduzidas à 10 filhotes (5 machos e 5 fêmeas). Os machos e as fêmeas de cada ninhada foram desmamados no 21º dia de vida e utilizados para o experimento. Após o desmame, os machos e as fêmeas de cada ninhada foram separados em grupos de cinco animais/caixa e mantidos sob as mesmas condições sociais durante todo o estudo. A fim de evitar o efeito da ninhada, foram usados 2 ou 3 animais de cada ninhada para avaliação comportamental. Todos os animais foram alimentados após o desmame até a idade adulta com ração comercial (Nuvilab®).



Protocolo experimental



Medidas do desenvolvimento pós-natal da prole

Após o nascimento das ninhadas, no dia 1 pós-natal, os filhotes foram contados, pesados e diferenciados de acordo com o sexo. A prole foi avaliada até o 21º dia pós-natal quanto ao:

- **Peso corporal:** esta medida foi realizada no 1º, 7º, 14º e 21º dias de vida. Dessa forma, comparando-se as medidas dos subgrupos poderíamos observar se o tratamento pré-natal e/ou a alimentação da mãe produziram algum efeito sobre o desenvolvimento ponderal dos filhotes.
- **Reflexo postural:** esta medida foi efetuada no 1º, 3º e 7º dias de vida. Cada filhote foi colocado sobre uma superfície plana, em decúbito dorsal medindo-se o reflexo de endireitamento, em segundos.
- **Dia de abertura dos olhos:** a partir do 13º dia de idade, os filhotes foram observados. A abertura dos olhos foi determinada pelo deslocamento parcial da fissura palpebral.
- **Ambulação:** esta medida foi realizada nos 8º e 13º dias de vida. Utilizamos uma arena quadrada, medindo 30 x 30 cm, com assoalho dividido em áreas iguais de 6 x 6

cm. Apenas um filhote era colocado por vez, na arena, quando contavam-se os quadrados percorridos durante um minuto.

No 21º dia de vida, os filhotes foram desmamados conforme citado anteriormente. As avaliações do desenvolvimento foram realizadas pela manhã.

EQUIPAMENTOS

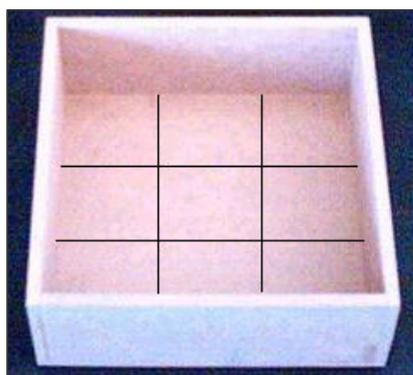
Aparelho para o Teste da Natação Forçada

Utilizamos um cilindro de acrílico (30 x 50 cm), contendo 30 cm de água na temperatura de 25°C, adaptado do modelo descrito por Porsolt e colaboradores (1978).



Campo Aberto

Após a avaliação dos animais no Teste da Natação Forçada os mesmos foram colocados em uma caixa de madeira, medindo 60X60x30cm, com quadrados demarcados (20X20cm) para posterior análise de deslocamento do animal (atividade motora).



Coleta de sangue

O sangue das fêmeas prenhez foi coletado dois dias antes do início do estresse de restrição (basal) e outras duas coletas foram realizadas no primeiro e no último dias do procedimento de estresse por volta de 10:00 h da manhã.

Para a prole adulta, foram realizadas coletas de sangue seriadas. A primeira coleta (basal) foi realizada dois dias antes do pré-teste e outras coletas foram feitas no dia do teste: imediatamente, 20 minutos e 60 minutos após o TNF.

A coleta de sangue de todos os animais foi realizada pela cauda. O sangue coletado foi colocado em tubos de ensaio gelados contendo ácido etilenediaminetetraacético (EDTA). As amostras foram centrifugadas a 2400 RPM por 20 minutos à 4°C e o plasma mantido a -20°C até a análise por radioimunoensaio.

Dosagem de corticosterona

As concentrações plasmáticas de CORT dos animais foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio com anticorpo específico para ratos e camundongos, com o kit comercial produzido pela ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA), com um protocolo modificado, que utiliza metade do volume dos reagentes, elaborado por Thrivikraman e colaboradores (Thrivikraman et al., 1997). A sensibilidade do teste é de 3.125 ng/ml, e as variações inter e intra-ensaios são de 10,3 e 7,1%, respectivamente. Foram seguidas as etapas:

- Diluição das amostras;
- Preparação da curva padrão;
- Preparação das duplicatas das amostras diluídas;
- Adição de CORT marcada radiativamente com I¹²⁵;
- Adição de anticorpo anti-CORT de origem caprina;

- Incubação por duas horas em temperatura ambiente;
- Adição de solução precipitadora;
- Centrifugação a 2300 RPM por 15 minutos;
- Descarte do sobrenadante;
- Contagem da radioatividade em Contador Gama.

Glândulas adrenais

Os animais avaliados no teste da natação forçada tiveram as glândulas adrenais retiradas após a última coleta de sangue, para verificação do peso relativo desta estrutura: peso do órgão/peso corporal x 1000.

PROCEDIMENTO

Teste da Natação Forçada

Os animais foram introduzidos individualmente no aparelho já descrito e deixados por 15 minutos para habituação (sessão pré-teste), 24 horas antes da avaliação comportamental. Logo depois dessa sessão, cada animal foi enxugado cuidadosamente e recolocado em suas caixa-moradia. Vinte e quatro horas depois, os animais passaram pela segunda sessão por um período de 5 minutos e os comportamentos de imobilidade, *swimming* e *climbing* foram registrados. As avaliações foram realizadas entre 9:30 h e 15:00 h e o comportamento filmado.

Campo Aberto

Logo após o teste de avaliação de comportamento tipo-depressivo, TNF (30 segundos depois), os animais foram avaliados por 5 minutos no campo aberto,

mantendo-se as mesmas condições experimentais. A finalidade deste teste é a de constatar possíveis alterações de atividade motora que possam interferir com o comportamento no TNF.

Análise dos dados

A comparação dos resultados obtidos foi feita por meio da ANOVA com dois fatores, para avaliar a influência dos fatores: Suplementação (dieta regular, óleo de coco, óleo de peixe), Grupo (controle, estresse pré-natal) e sua possível interação. ANOVA para medidas repetidas foi usada para analisar o peso corporal e o consumo de ração durante a amamentação e para as medidas de CORT da prole adulta. A ANCOVA foi usada para medidas de CORT materna. Comparamos o efeito entre os grupos pelo teste *a posteriori* de Newman-Keuls, quando necessário. Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney foi usado para abertura dos olhos. Em todos os casos, um valor de p igual ou inferior a 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

I. Peso corporal durante a prenhez e amamentação, consumo de ração durante a amamentação, tamanho da ninhada e concentração de corticosterona materna

Durante a prenhez, a ANOVA mostrou que houve efeito da manipulação pré-natal [$F(1,36)=11,81$, $p=0,001$] e do tipo de dieta [$F(2,36)=3,32$, $p=0,047$] sobre o peso corporal. Não houve interação entre os fatores [$F(2,36)=1,04$, $p=0,363$]. O teste *a posteriori* apontou que o grupo EPN ganhou menos peso em relação ao controle ($p=0,0003$). Em relação ao tipo de dieta, animais alimentados com as dietas regulares e de peixe ganharam menos peso do que aqueles que receberam dieta de coco ($p=0,028$; $p=0,011$) respectivamente (Gráfico 1).

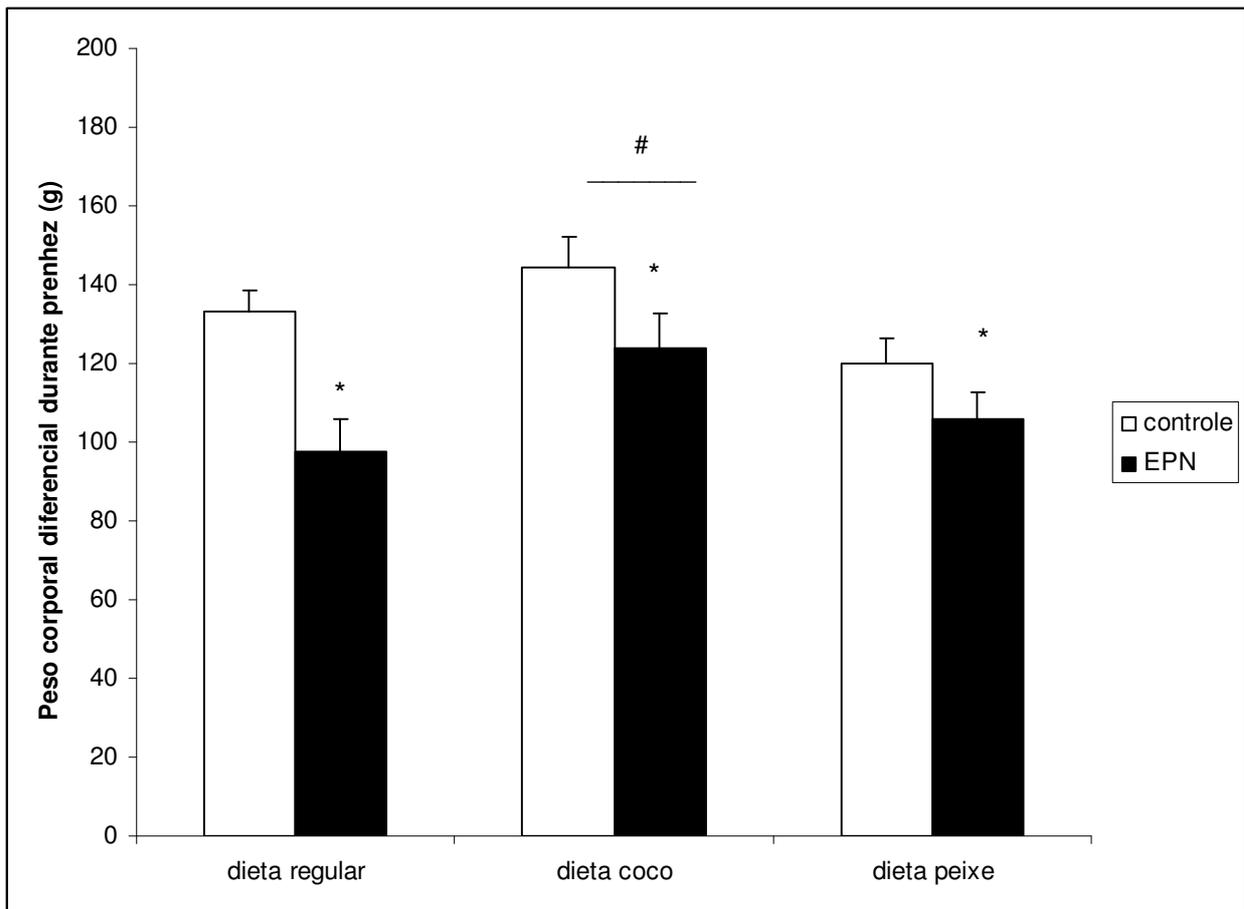


Gráfico 1 - Média±EPM do peso corporal diferencial (peso final - inicial) durante a prenhez de mães submetidas ao estresse e alimentadas com as dietas regular, coco ou peixe (n=5-12). Newman-Keuls * p<0,001 representa a diferença entre CLT x EPN; # p<0,05 diferença entre dieta coco x regular e peixe.

Embora o peso das ratas durante a prenhez tenha sido influenciado pelo estresse e pelo tipo de dieta, a ANOVA não demonstrou efeito da manipulação pré-natal [F(1,36)=0,05, p=0,824], do tipo de dieta [F(2,36)=0,44, p=0,645] nem da interação entre os fatores [F(2,36)=0,20, p=0,812] sobre o tamanho da ninhada (Tabela 2).

Tabela 2 - Número médio de filhotes por ninhada em cada uma das manipulações.

Dietas	N	Controle	N	EPN
Regular	8	12,25±1,23	12	12,25±0,90
Coco	5	12,80±1,28	5	14,00±1,87
Peixe	5	12,80±0,92	7	12,28±1,04

Durante a amamentação, a ANOVA para medidas repetidas mostrou que não houve efeito da manipulação pré-natal sobre o consumo de ração [F(1,36)=0,00, p=0,978], mas houve efeito da dieta [F(2,36)=5,30, p=0,009], sem interação entre os fatores [F(2,36)=0,27, p=0,766]. O teste *a posteriori* apontou que o consumo de ração suplementada com óleo de peixe e gordura de coco é significativamente menor do que o de dieta regular (p=0,017; p=0,055), respectivamente. Houve efeito do tempo sobre o consumo [F(2,72)=232,48, p=0,0001], com um aumento significativo da ingestão de ração ao longo das semanas em todos os grupos (antes parto x 1^a. semana, p=0,0001; 2^a. semana x 1^a. semana, p=0,0001). Houve interação entre tempo e grupo [F(2,72)=4,33, p=0,017], mas sem diferença significativa entre os grupos controle e EPN ao longo das semanas. Não houve interação entre semana e dieta [F(4,72)=1,86, p=0,127], nem interação geral entre os fatores [F(4,72)=1,51, p=0,209] (Gráfico 2).

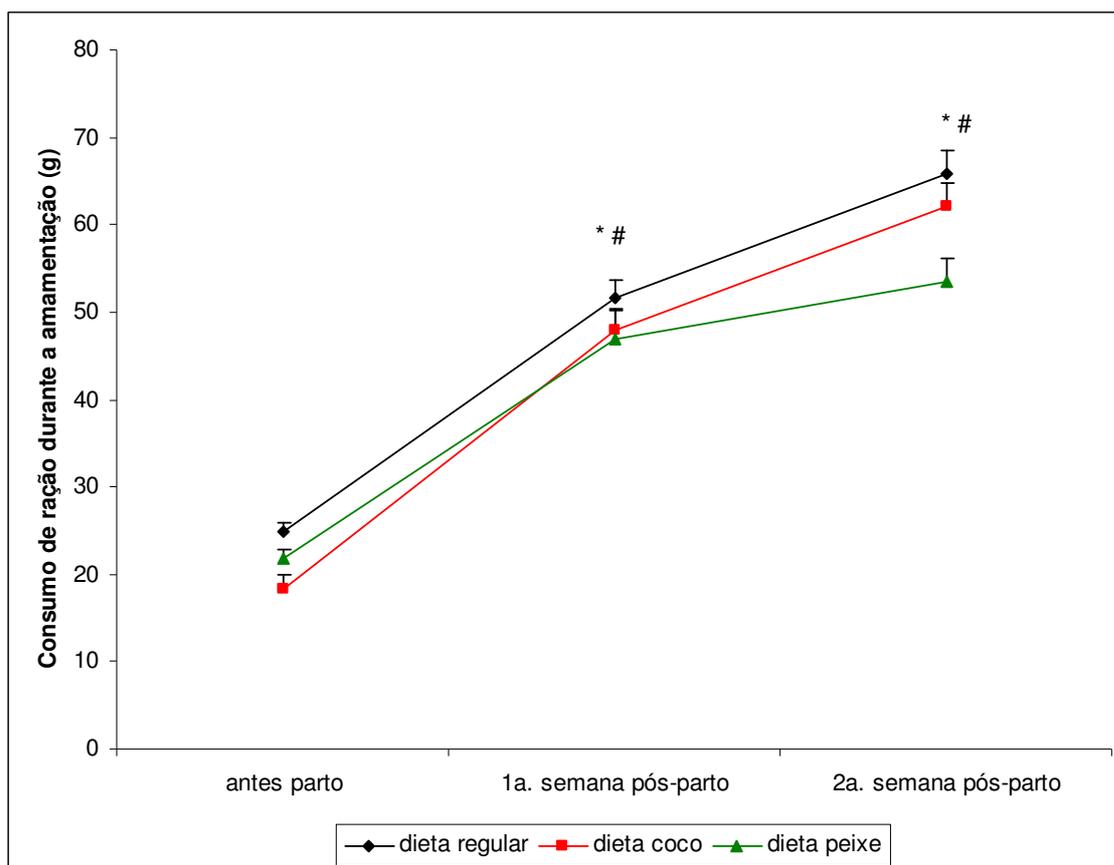


Gráfico 2 - Média±EPM do consumo de ração durante a amamentação de mães submetidas ao estresse e alimentadas com as dietas regular, coco ou peixe (n=5-12). Newman-Keuls * p<0,001 representa a diferença em relação à 1ª. semana; # p<0,05 representa a diferença entre a dieta regular x peixe.

Quanto ao peso corporal durante a amamentação, a ANOVA para medidas repetidas não demonstrou efeito da manipulação durante a prenhez sobre o peso corporal [F(1,36)=1,75, p=0,194], mas houve efeito da dieta [F(2,36)=3,37, p=0,045] e também interação entre os fatores [F(2,36)=3,20, p=0,05]. Houve efeito do tempo sobre o peso corporal [F(3,108)=18,62, p=0,000] mas não houve interação entre semana e grupo [F(3,108)=0,57, p=0,638] nem interação entre semana e dieta [F(6,108)=0,82, p=0,56]. Não houve interação geral entre os fatores [F(6,108)=0,26, p=0,956]. O teste *a posteriori* da interação entre grupo e dieta, apontou que o grupo controle-dieta de coco apresentou maior ganho de peso quando comparado aos grupos dieta regular (p=0,05), dieta de peixe (p=0,005). Além disso, o grupo EPN-dieta coco ganhou menos

peso do que seu grupo controle ($p=0,03$) (Gráfico 3).

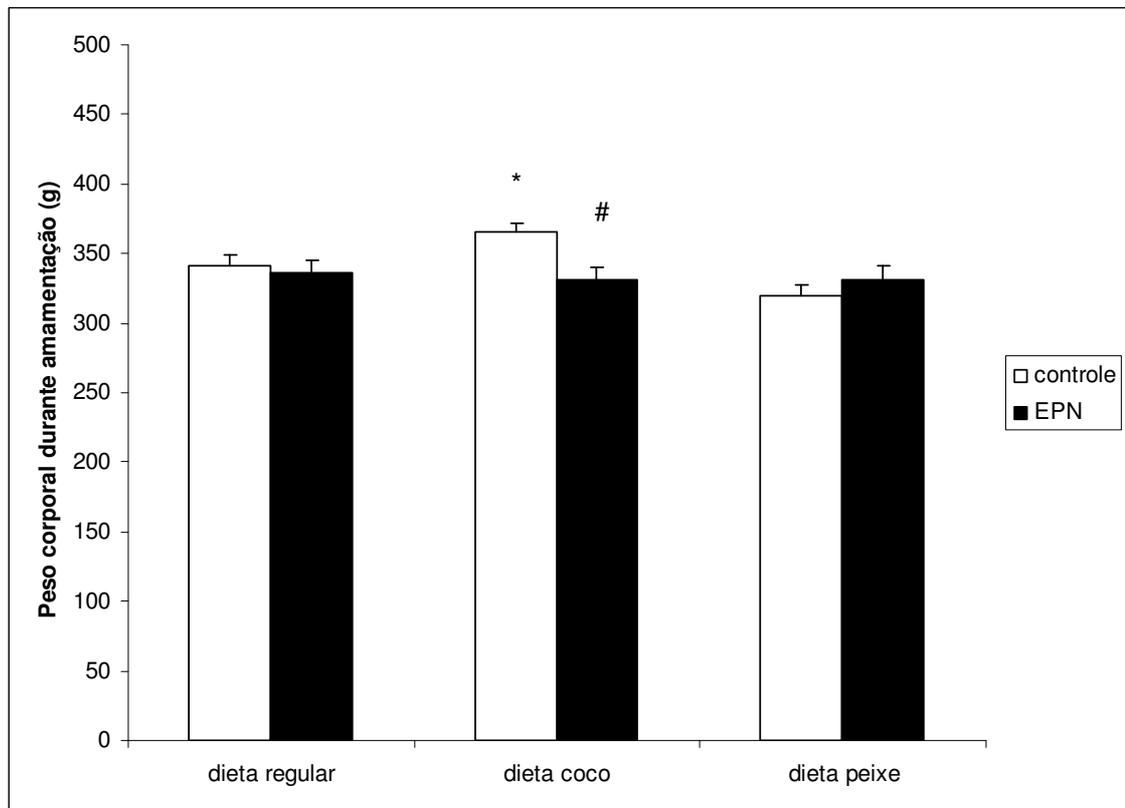


Gráfico 3 - Média \pm EPM do peso corporal das mães durante a amamentação ($n=5-12$). Newman-Keuls * $p<0,05$ representa a diferença dieta coco CLT x regular e peixe; # $p<0,05$ representa a diferença entre CLT x EPN dieta coco.

Em relação às concentrações plasmáticas de CORT, a ANCOVA (níveis basais como covariada) mostrou efeito da manipulação durante a prenhez [$F(2,34)=63,21$, $p=0,0001$]. Não houve efeito a dieta [$F(4,68)=0,51$, $p=0,725$] ou interação entre os fatores [$F(4,68)=1,76$, $p=0,147$]. A análise *a posteriori* apontou que o grupo EPN apresentou maior concentração de CORT quando comparado ao controle ($p=0,0001$) no primeiro dia do estresse de restrição sendo que esta diferença foi mantida até o último dia de estresse ($p=0,0001$) (Gráfico 4).

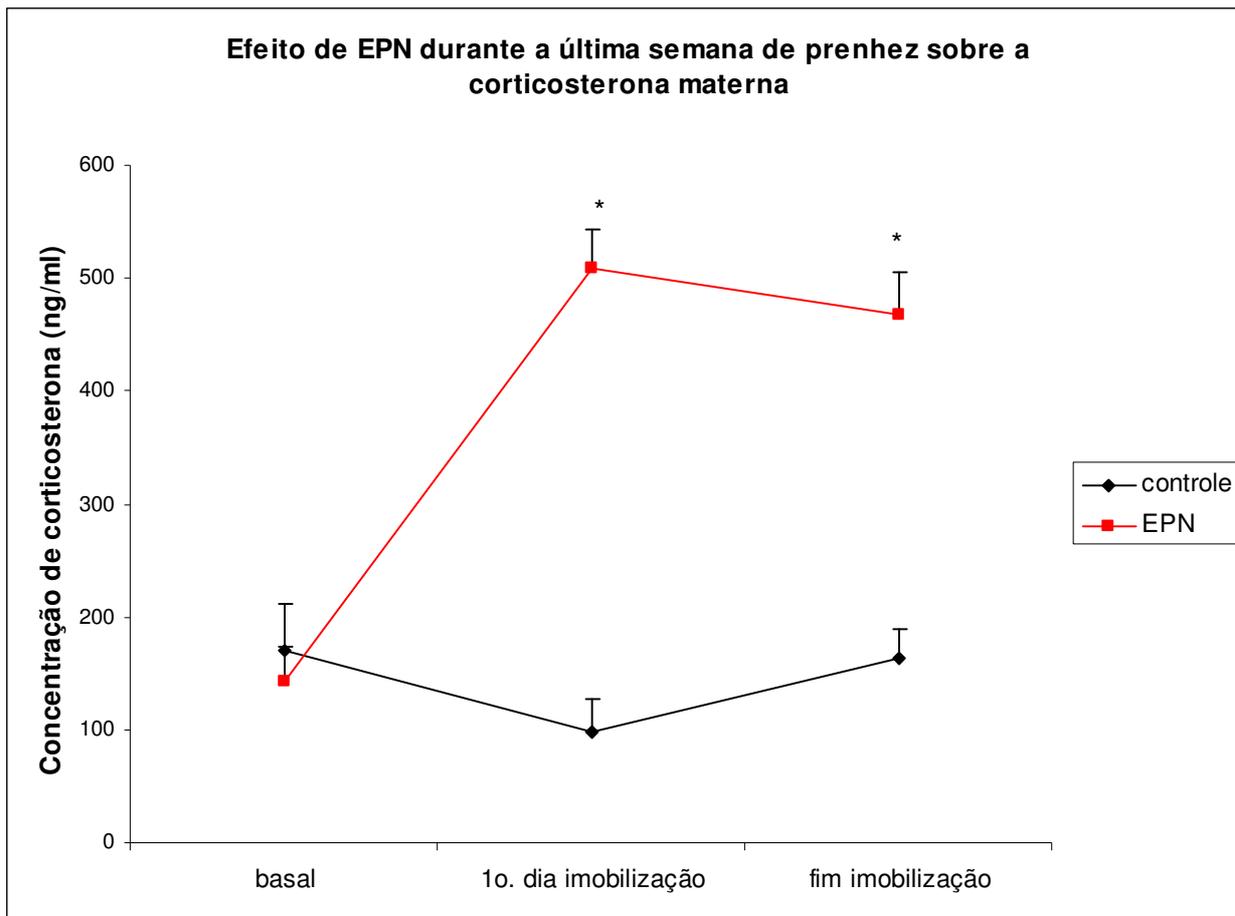


Gráfico 4 - Média±EPM da concentração plasmática de CORT durante a prenhez de mães CLT (n=18) e EPN (n=24). Newman-Keuls * p<0,001 diferença entre os grupos CLT x EPN.

II. Avaliação do desenvolvimento pós-natal de machos

No 1º dia de vida, a ANOVA demonstrou que não houve efeito da manipulação pré-natal sobre o reflexo postural [$F(1,140)=0,50$; $p=0,480$], nem do tipo de dieta [$F(2,140)=0,84$; $p=0,433$]. Houve interação entre os fatores [$F(2,140)=4,28$; $p=0,016$]. O teste de Newman Keuls demonstrou que o grupo controle-dieta peixe demorou mais tempo para endireitar o corpo em relação ao grupo controle-dieta regular ($p=0,05$). De forma semelhante, o grupo EPN-dieta regular apresentou a mesma tendência quando comparado ao seu controle ($p=0,058$). No 3º dia de vida, não houve efeito da manipulação pré-natal [$F(1,140)=1,22$; $p=0,271$], nem efeito da dieta [$F(2,140)=0,53$; $p=0,587$] ou interação entre os fatores [$F(2,140)=0,69$; $p=0,501$]. Quanto ao 7º dia de vida, não foi verificado efeito da manipulação pré-natal [$F(1,140)=3,07$; $p=0,082$], da dieta [$F(2,140)=0,60$; $p=0,55$] ou da interação entre os fatores [$F(2,140)=0,35$; $p=0,703$] sobre o reflexo postural.

Estes resultados mostram que a dieta de peixe aumentou a duração do reflexo postural no 1º dia de vida quando comparado com a dieta regular e que o EPN parece retardar essa resposta (Tabela 3).

Tabela 3. Reflexo postural pós-natal em segundos (Média±EPM).

Grupos	Dia 1		Dia 3		Dia 7	
	Controle	EPN	Controle	EPN	Controle	EPN
Dieta regular N=15-33/ grupo	6,45±2,12	17,57±3,17	1,83±0,23	1,94±0,23	1,05±0,10	1,01±0,07
		<i>f</i>				
Dieta coco N=24-21/grupo	12,31±2,19	12,21±2,56	1,96±0,22	1,54±0,11	1,02±0,14	0,87±0,05
Dieta peixe N=21-32/grupo	18,31±3,53	12,39±2,28	2,16±0,27	1,82±0,23	1,14±0,10	0,93±0,06
	*					

Newman-Keuls * $p < 0,05$ representa a diferença entre dieta peixe x dieta regular no grupo controle; f $p = 0,058$ representa tendência EPN x controle na dieta regular.

Outra variável analisada foi o peso corporal dos filhotes durante a amamentação. No 1º dia de vida, verificamos que houve efeito da manipulação pré-natal sobre o peso corporal [$F(1,140)=7,19$; $p=0,008$]. Não houve efeito do tipo de dieta [$F(2,140)=1,22$; $p=0,299$] nem interação entre os fatores [$F(2,140)=1,69$; $p=0,189$]. O teste de Newman Keuls mostrou que o EPN reduziu o peso corporal de machos ao nascer quando comparado ao controle ($p=0,007$) Gráfico 5.

No 7º e 14º dias de vida, constatamos que não houve efeito da manipulação pré-natal [$F(1,140)=0,71$; $p=0,400$] e [$F(1,140)=2,86$; $p=0,093$], respectivamente. Verificamos efeito da dieta [$F(2,140)=6,47$; $p=0,002$]; [$F(2,140)=16,88$; $p=0,000$] e interação entre os fatores [$F(2,140)=4,08$; $p=0,019$]; [$F(2,140)=5,18$; $p=0,007$], respectivamente. Quanto ao 21º dia de vida, verificamos que não houve efeito da manipulação pré-natal sobre o peso corporal [$F(1,140)=3,24$; $p=0,074$] mas houve efeito do tipo de dieta [$F(2,140)=29,64$; $p=0,0001$], e interação entre os fatores [$F(2,140)=8,49$; $p=0,0001$]. A partir do 7º. dia de vida, o teste *a posteriori* mostrou que

o EPN prejudicou o crescimento dos animais no grupo alimentado com ração regular em relação ao controle ($p=0,012$), sendo este prejuízo prevenido nos animais sob as dietas de coco e de peixe comparados com a dieta regular ($p=0,0001$ e $p=0,018$, respectivamente). Essas alterações foram mantidas no 14º. (EPN regular x controle, $p=0,007$; EPN regular x coco e peixe, $p=0,0001$ e $p=0,012$) e no 21º. dias (EPN regular x controle, $p=0,0001$; EPN regular x coco e peixe, $p=0,0001$ e $p=0,0001$) (Gráfico 6).

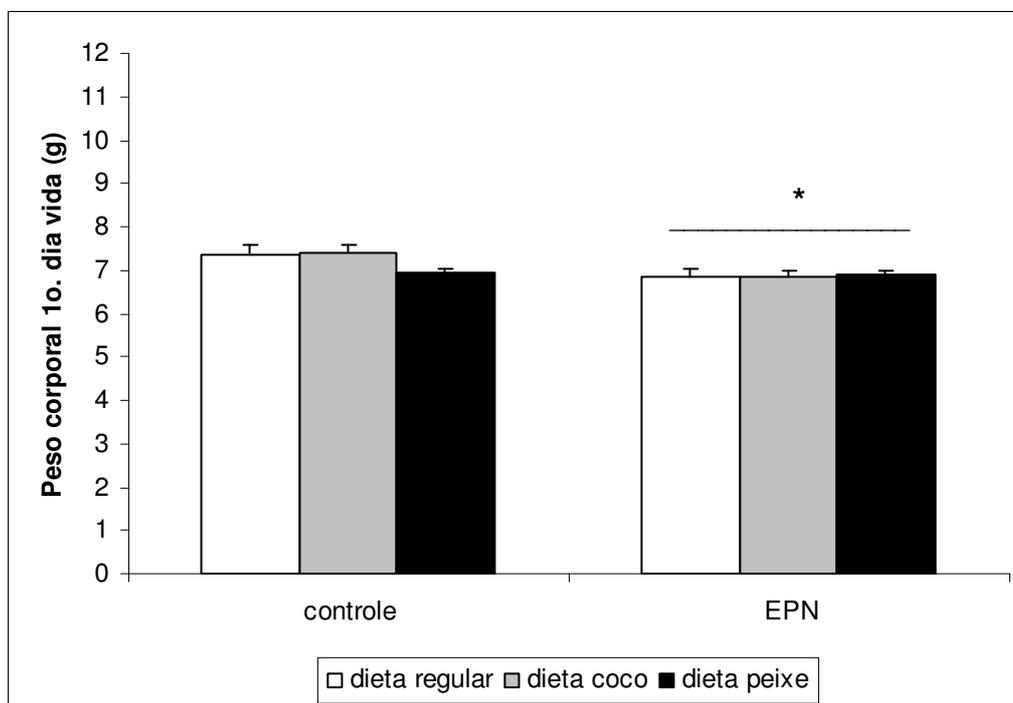


Gráfico 5 - Média±EPM do peso corporal no 1º. dia de vida de filhotes machos CTL (n=60) e EPN (n=86). Neuman-Keuls * $p<0,05$ representa a diferença entre CLT x EPN.

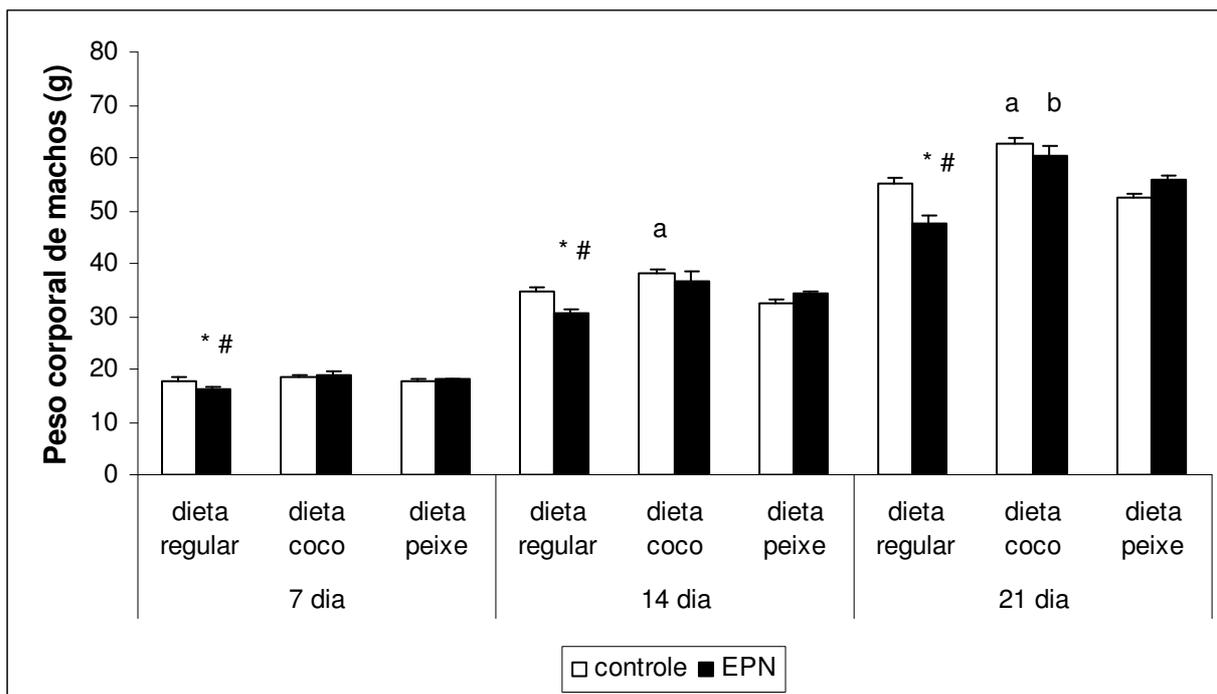


Gráfico 6 - Média±EPM do peso corporal entre 7º e 21º dias de vida de filhotes machos (n=15-33/manipulação/dieta). Neuman-Keuls * p<0,05 representa a diferença entre CLT x EPN, # p<0,05 representa a diferença entre EPN regular x coco e peixe, a p<0,05 representa a diferença entre CTL coco x regular e peixe, b p<0,05 representa a diferença entre EPN coco x peixe.

A atividade locomotora dos filhotes também foi avaliada nos 8º e 13º dias de vida. Verificamos que não houve efeito da manipulação pré-natal no 8º dia de vida [F(1,140)=0,14; p=0,704], do tipo de dieta [F(2,140)=0,62; p=0,539], nem interação entre os fatores [F(2,140)=0,04; p=0,961]. No 13º dia, constatamos efeito da manipulação pré-natal [F(1,140)=15,65; p=0,0001], do tipo de dieta [F(2,140)=3,61; p=0,029] e interação entre os fatores [F(2,140)=3,57; p=0,031]. O teste *a posteriori* mostrou que o grupo EPN alimentado com dieta regular apresentou aumento da atividade motora quando comparado com o grupo controle (p=0,0001). Os animais do grupo controle-dieta de coco também tiveram maior atividade locomotora em relação aos grupos dieta regular e peixe (p=0,016 e p=0,048, respectivamente). Os resultados estão sumariados no gráfico 7.

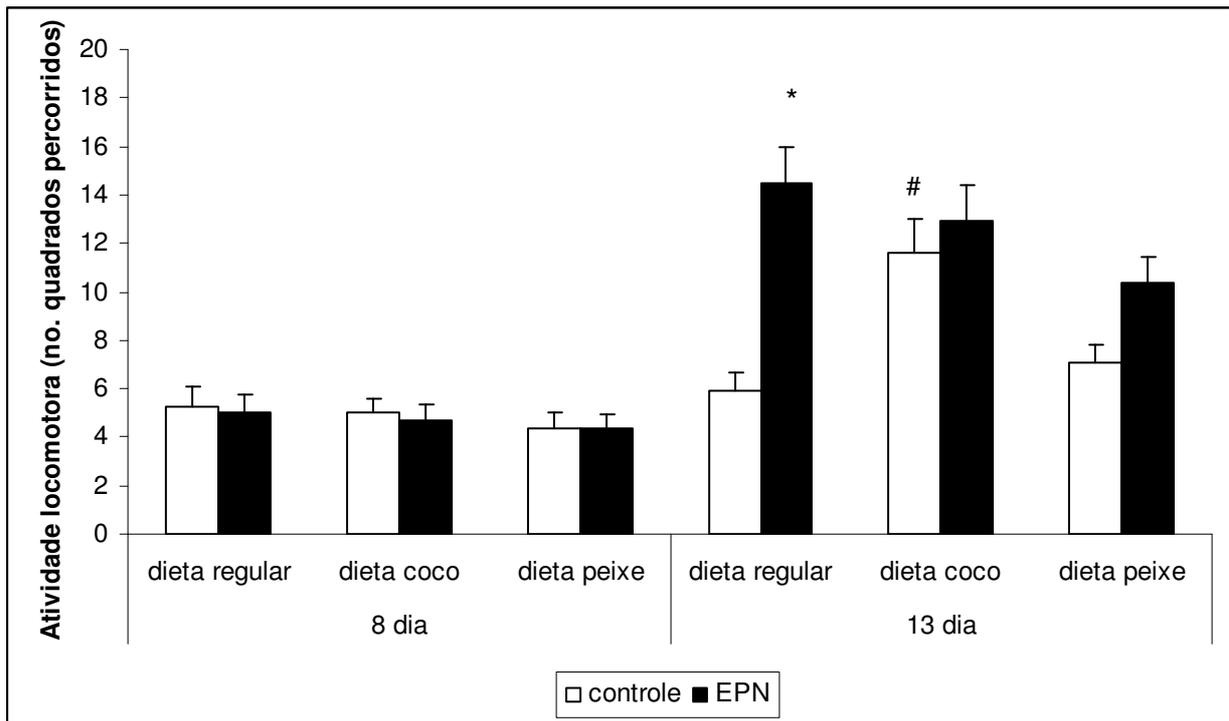


Gráfico 7 - Média±EPM da atividade locomotora no 8º. e 13º. dias de vida de filhotes machos (n=15-33/manipulação/dieta). Neuman-Keuls * p<0,05 representa a diferença entre CLT x EPN, # p<0,05 representa a diferença entre CTL coco x regular e peixe.

Quanto à abertura dos olhos em machos, observou-se diferenças entre os grupos [H (5, N= 146) =16,14, p<0,006]. O grupo controle suplementado com óleo de peixe mostrou atraso na abertura do olho quando comparado com o grupo controle sob dieta regular (Tabela 4).

Tabela 4. Abertura dos olhos em machos (Média±EPM).

grupos	Controle	EPN
Dieta regular N=15-33/ grupo	13,40±0,13	13,88±0,15
Dieta com gordura de coco N=24-21/grupo	13,67±0,13	13,81±0,09
Dieta com óleo de peixe N=21-32/grupo	14,04±0,14 *	14,09±0,09

Mann-Whitney *p< 0.05 representa a diferença entre grupo controle sob dieta regular x dieta com óleo de peixe.

III. Avaliação do desenvolvimento pós-natal de fêmeas

No 1º dia de vida, a ANOVA mostrou ausência de efeito da manipulação pré-natal sobre o reflexo postural [$F(1,148)=1,77$; $p=0,186$], mas verificamos efeito do tipo de dieta [$F(2,148)=3,43$; $p=0,035$]. Não houve interação entre os fatores [$F(2,148)=2,32$; $p=0,102$]. No 3º dia de vida, não houve efeito da manipulação pré-natal [$F(1,14)=0,90$; $p=0,343$], do tipo de dieta [$F(2,148)=0,18$; $p=0,835$], nem da interação entre os fatores [$F(2,148)=0,23$; $p=0,796$]. Quanto ao 7º dia de vida, verificamos que não houve efeito da manipulação pré-natal [$F(1,148)=0,28$; $p=0,599$], do tipo de dieta [$F(2,148)=1,40$; $p=0,25$], nem da interação entre os fatores [$F(2,148)=0,05$; $p=0,948$] sobre o reflexo postural.

Os dados mostram que independente do EPN, a dieta de coco reduziu a duração do reflexo postural no 1º dia de vida, quando comparada com as dietas regular e de peixe ($p=0,022$ e $p=0,024$, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5. Reflexo postural pós-natal em segundos (Média±EPM).

Grupos	Dia 1		Dia 3		Dia 7	
	Controle	EPN	Controle	EPN	Controle	EPN
Dieta regular N=18-28/grupo	13,50±3,24	26,71±5,35	2,42±0,64	3,01±0,59	1,14±0,12	1,20±0,11
Dieta de coco N=23-25/grupo	10,40±1,98 *	12,58±2,51 *	2,07±0,25	3,07±1,32	1,28±0,14	1,30±0,25
Dieta de peixe N=26-34/grupo	21,72±4,57	18,75±2,84	2,27±0,46	2,34±0,48	1,00±0,11	1,11±0,08

Newman-Keuls * $p<0,05$ representa a diferença entre a dieta coco x regular e peixe.

Quanto ao peso corporal das fêmeas, no 1º dia de vida, verificamos que houve efeito da manipulação pré-natal [$F(1,148)=7,60$; $p=0,006$]. Porém, não houve efeito do tipo de dieta [$F(2,148)=1,63$; $p=0,199$] ou interação entre os fatores [$F(2,148)=2,03$; $p=0,135$]. Como observado em machos, o teste de Newman Keuls mostrou que o EPN reduziu o peso corporal ao nascer quando comparado ao controle ($p=0,006$, Gráfico 8).

Não houve efeito da manipulação pré-natal sobre o peso corporal medido nos 7º e 14º dias de vida, [$F(1,148)=0,25$; $p=0,616$]; [$F(1,148)=2,90$; $p=0,091$]. Porém foram detectados efeito do tipo de dieta [$F(2,148)=10,46$; $p=0,0001$]; [$F(2,148)=19,42$; $p=0,0001$] e interação entre os fatores [$F(2,148)=3,17$; $p=0,045$]; [$F(2,148)=5,57$; $p=0,005$], respectivamente. Quanto ao 21º dia de vida, verificamos que efeito da manipulação pré-natal sobre o peso corporal [$F(1,148)=5,01$; $p=0,027$], do tipo de dieta [$F(2,148)=45,24$; $p=0,0001$], e interação entre os fatores [$F(2,148)=10,32$; $p=0,0001$]. A partir do 7º. dia de vida, o teste *a posteriori* apontou que o EPN prejudicou o crescimento dos animais no grupo alimentado com ração regular em relação ao controle ($p=0,016$), sendo este prejuízo prevenido nos animais sob as dietas de coco e de peixe comparado com a dieta regular ($p=0,0001$ e $p=0,004$), respectivamente. Essas alterações foram mantidas no 14º. (EPN regular x controle, $p=0,003$; EPN regular x coco e peixe, $p=0,0001$ e $p=0,006$) e 21º. dias de vida (EPN regular x controle, $p=0,000$; EPN regular x coco e peixe, $p=0,0001$ e $p=0,0001$, Gráfico 9).

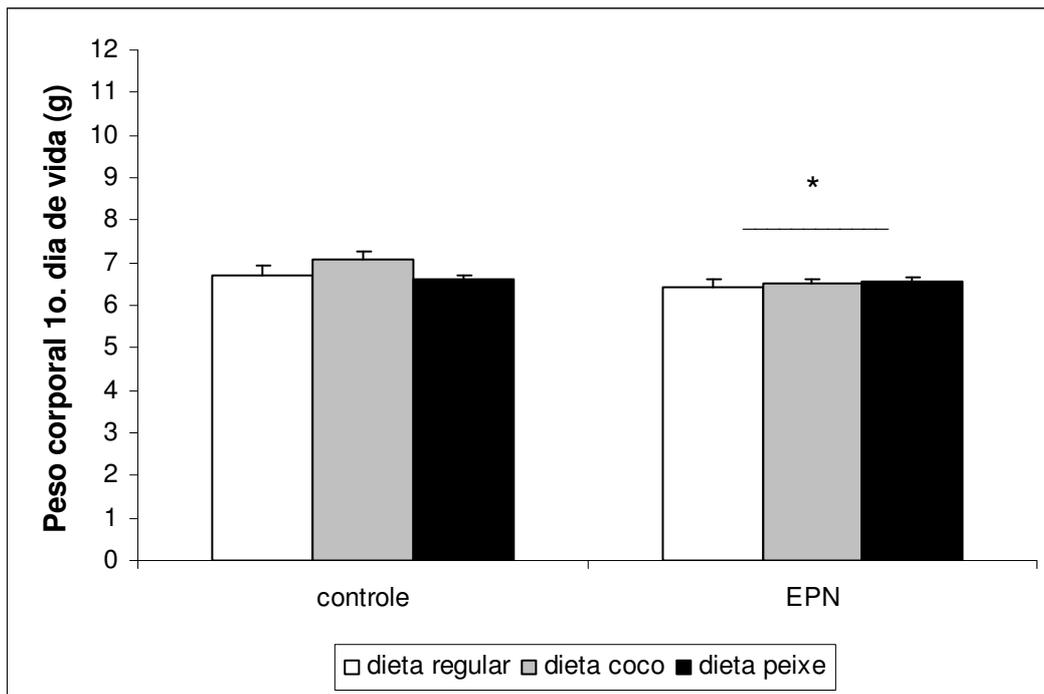


Gráfico 8 - Média±EPM do peso corporal 1º. dia de vida de filhotes fêmeas CTL (n=67) e EPN (n=87). Newman-Keuls * p<0,05 representa a diferença entre CLT x EPN.

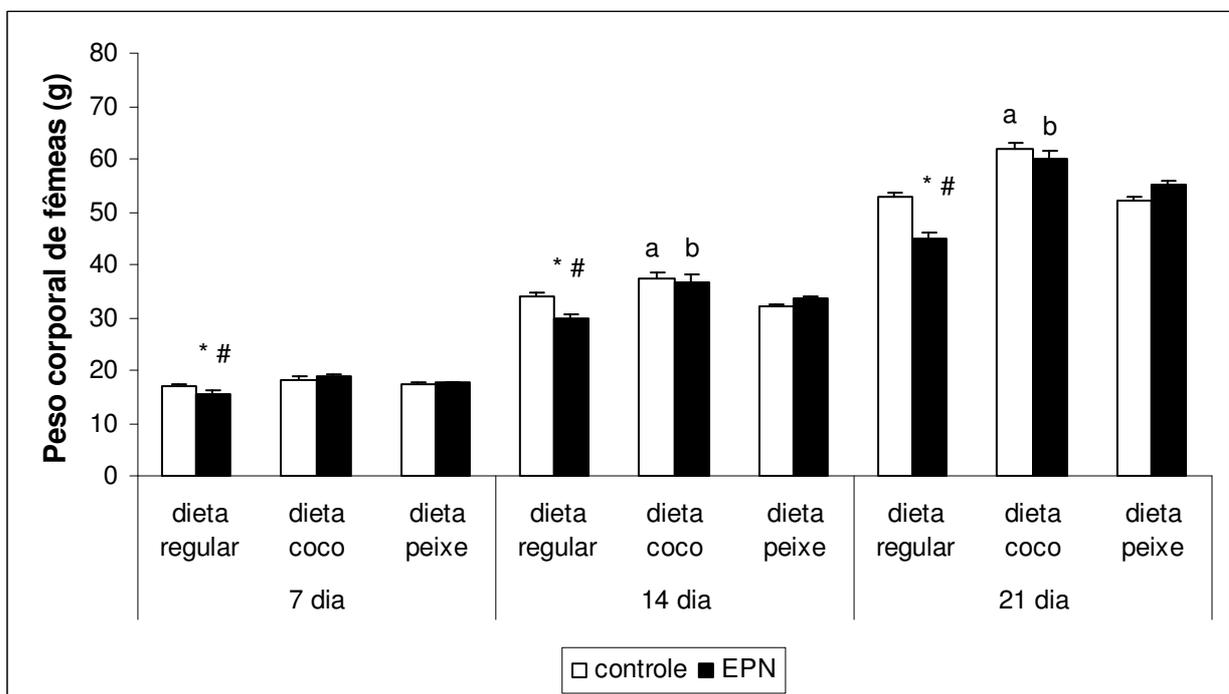


Gráfico 9 - Média±EPM do peso corporal entre 7º. e 21º. dia de vida de filhotes fêmeas (n=18-34). Newman-Keuls * p<0,05 representa a diferença entre CLT x EPN, # p<0,05 representa a diferença entre EPN regular x coco e peixe, a p<0,05 representa a diferença entre CTL coco x regular e peixe, b p<0.05 representa a diferença entre EPN coco x peixe.

Quanto à atividade locomotora nos 8º e 13º dias de vida, verificamos que não houve efeito da manipulação pré-natal no 8º dia de vida [F(1,148)=0,67; p=0,415], do tipo de dieta [F(2,148)=2,37; p=0,097], nem interação entre os fatores [F(2,148)=0,55; p=0,575]. No 13º dia, não houve efeito da manipulação pré-natal [F(1,148)=2,75; p=0,099]. Porém, observou-se efeito do tipo de dieta [F(2,148)=3,79; p=0,025] e a interação entre os fatores [F(2,148)=10,11; p=0,0001].

O teste *a posteriori* mostrou que as fêmeas do grupo EPN, cujas mães foram alimentadas com dieta regular apresentaram aumento da atividade motora quando comparadas com as do grupo controle (p=0,0001), sendo que este efeito foi prevenido pela dieta de peixe (p=0,013). Por outro lado, nos animais controle, a dieta de coco *per se* aumentou a atividade locomotora em relação à dieta regular e peixe (p=0,0001; p=0,021) respectivamente (Gráfico 10).

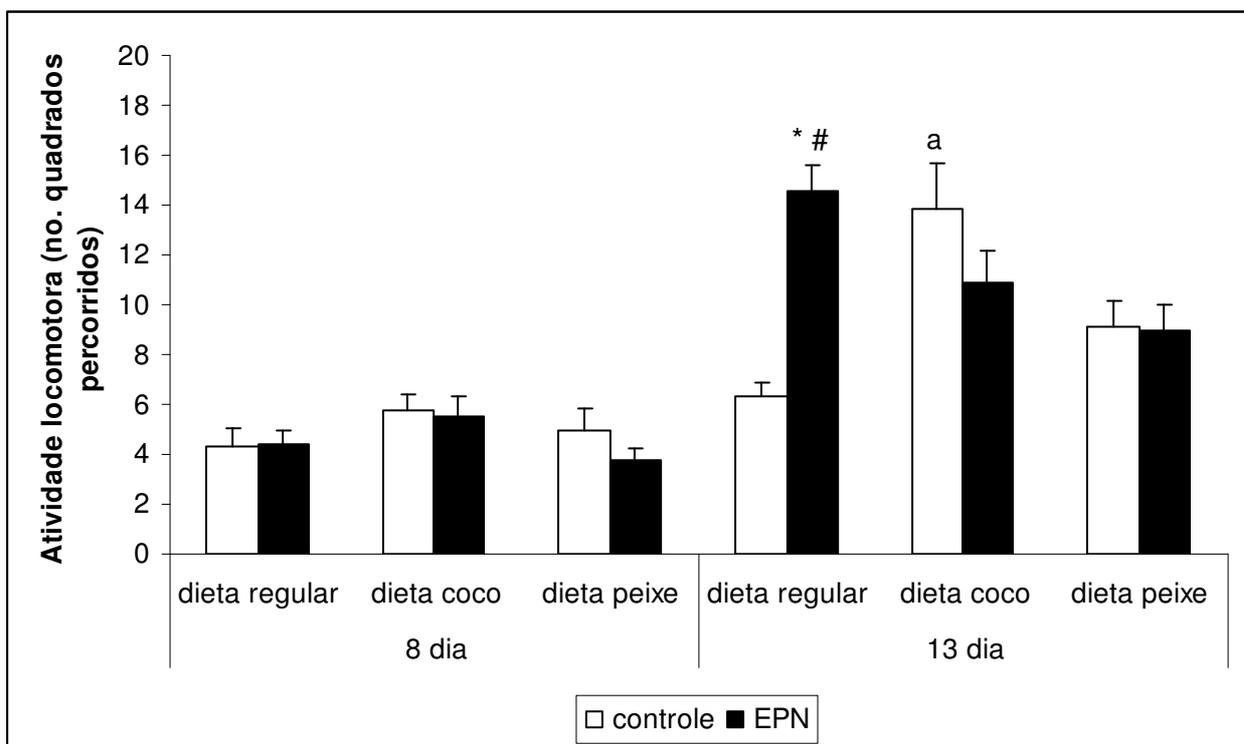


Gráfico 10 - Média±EPM da atividade locomotora no 8º. e 13º. dias de vida de filhotes de fêmeas (n=18-34). Newman-Keuls * p<0,05 representa a diferença entre CTL x EPN, #p<0,05 representa a diferença entre EPN regular x peixe, a p<0,05 representa a diferença entre CTL coco x regular e peixe.

Em fêmeas, não houve diferença entre os grupos [H (5, N= 154) =10,41, $p>0,064$ (tabela 5).

Tabela 5. Abertura dos olhos em fêmeas (Média±EPM).

Grupos	Controle	EPN
Dieta regular N=18-28/ grupo	13,44±0,20	13,93±0,15
Dieta com gordura de coco N=23-25/grupo	13,61±0,12	13,76±0,10
Dieta com óleo de peixe N=26-34/grupo	13,88±0,13	13,78±0,09

IV. Avaliação comportamental de macho adulto

A ANOVA mostrou efeito da manipulação pré-natal sobre o peso corporal [F(1,53)=10,19, p=0,002], mas não houve efeito do tipo de dieta [F(2,53)=0,56, p=0,572] nem interação entre os fatores [F(2,53)=2,12, p=0,129]. O teste *a posteriori* apontou que o grupo EPN apresentou redução no peso quando comparado ao grupo controle (p=0,004). Estes resultados estão sumarizados no Gráfico 11.

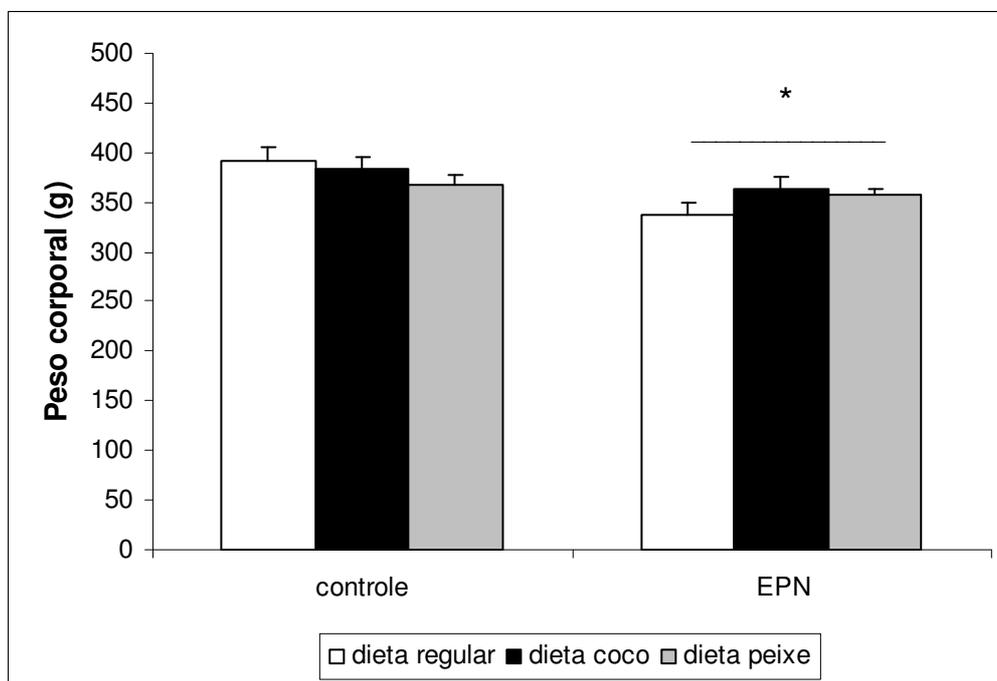


Gráfico 11 - Média±EPM do peso corporal de machos adultos CTL (n=29) e EPN (n=30). Newman-Keuls * p<0,05 representa a diferença entre CLT x EPN.

Em relação ao tempo de imobilidade no TNF, a ANOVA demonstrou efeito da manipulação pré-natal [F(1,53)=5,08, p=0,028], mas não houve efeito do tipo de dieta [F(2,53)=0,31, p=0,731] nem interação entre os fatores [F(2,53)=1,82, p=0,172]. O teste *a posteriori* apontou que o grupo EPN apresentou redução significativa no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle (p=0,021). Quanto ao swimming,

verificamos efeito do grupo [$F(1,53)=4,36$, $p=0,041$], e da dieta [$F(2,53)=3,70$, $p=0,031$]. Não houve interação entre os fatores [$F(2,53)=2,88$, $p=0,065$]. O teste a posteriori apontou que o grupo EPN apresentou aumento significativo no tempo de swimming quando comparado ao grupo controle ($p=0,04$) e que o grupo alimentado com dieta de peixe mostrou maior tempo de swimming em relação à dieta regular ($p=0,02$). Quanto ao climbing, não houve efeito do grupo [$F(1,53)=0,1$, $p=0,753$], mas houve efeito de dieta [$F(2,53)=5,61$, $p=0,006$]. Não houve interação entre os fatores [$F(2,53)=1,83$, $p=0,17$]. O teste de Newman Keuls apontou que o grupo sob dieta de peixe apresenta aumento significativo deste comportamento quando comparado aos animais sob dieta regular ($p=0,01$) e dieta de coco ($p=0,006$). (Gráfico 12).

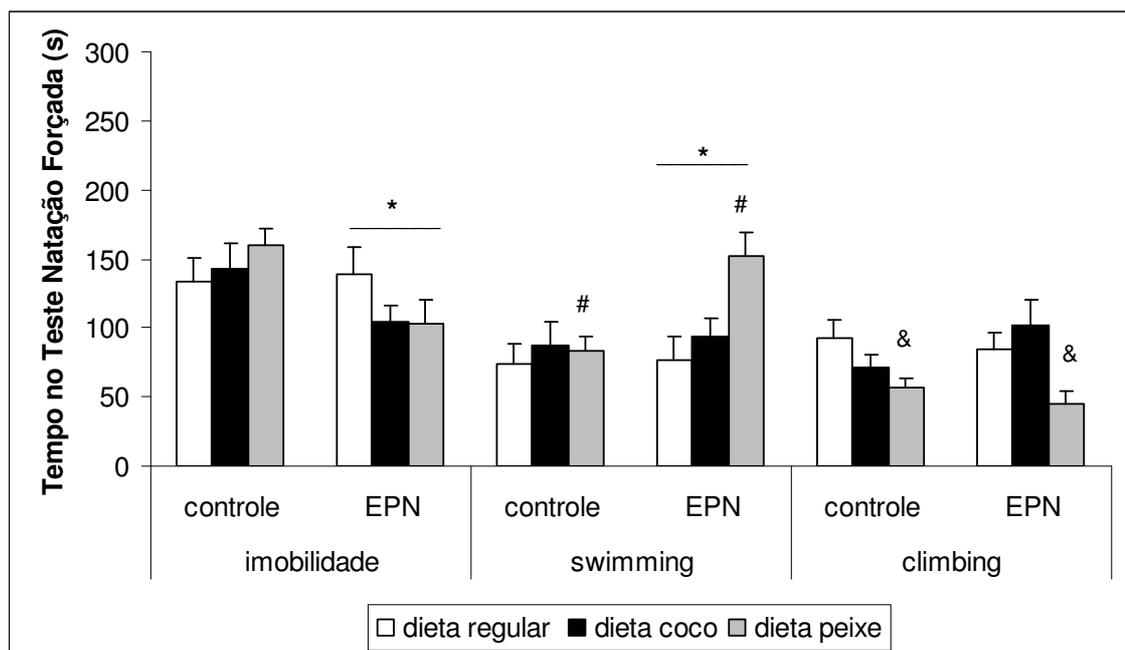


Gráfico 12 - Média±EPM do tempo de imobilidade no Teste da Natação Forçada de macho(n= 9-11/grupo). Newman-Keuls * $p<0,05$ representa a diferença entre CLT x EPN; # $p<0,05$ representa a diferença entre dieta peixe x dieta regular; & $p<0,05$ representa a diferença entre dieta peixe x regular e coco.

Quanto à atividade locomotora no campo aberto, verificamos que não houve efeito da manipulação pré-natal [$F(1,53)=2,11$; $p=0,152$], nem do tipo de dieta

[$F(2,53)=0,86$; $p=0,430$] , mas houve interação entre os fatores [$F(2,53)=3,12$; $p=0,052$].

O teste a posteriori de Newman Keuls não demonstrou diferenças entre os grupos (Gráfico 13).

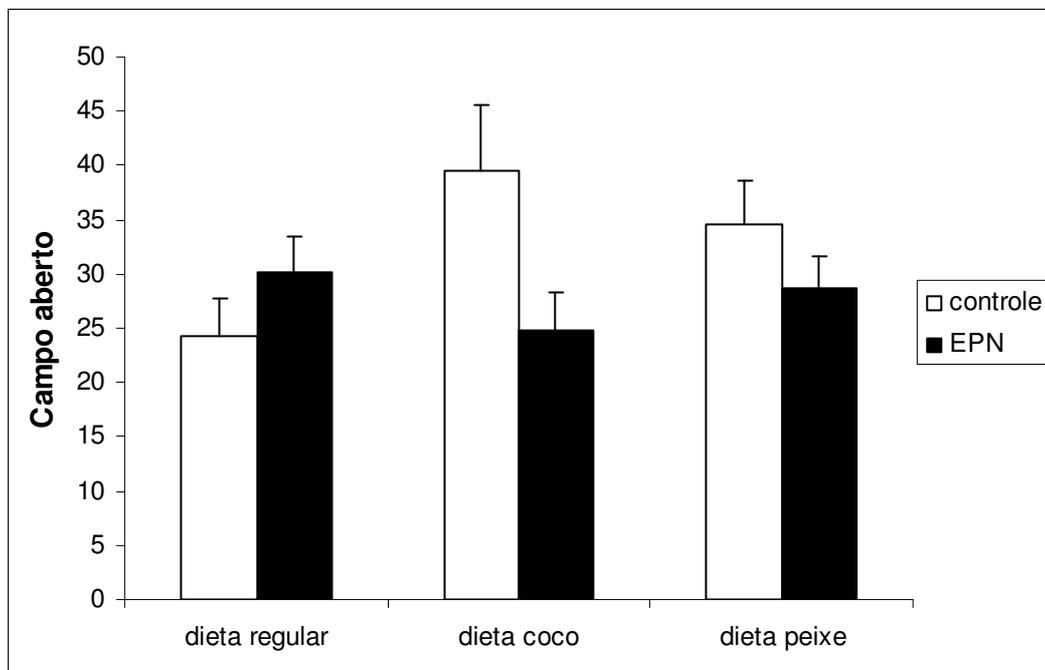


Gráfico 13 - Média±EPM da atividade locomotora de macho adulto (n=9-11).

Outra variável analisada foi o peso das adrenais. A ANOVA não mostrou efeito do grupo [$F(1,53)=1,01$; $p=0,32$], da dieta [$F(2,53)=0,37$; $p=0,695$] ou interação entre os fatores [$F(2,53)=0,32$; $p=0,728$] (Tabela 6).

Tabela 6. Peso relativo das adrenais de ratos machos.

Grupos	Peso das adrenais (g)	
	Controle	EPN
Dieta regular N=9/grupo	0,15±0,01	0,16±0,01
Dieta de coco N=10-11/grupo	0,15±0,01	0,15±0,00
Dieta de peixe N=10/grupo	0,15±0,01	0,16±0,01

Em relação às concentrações plasmáticas de CORT, a ANOVA para medidas repetidas não mostrou efeito do grupo [F(1,53)=3,59, p=0,063], mas houve efeito do tipo de dieta [F(2,53)=8,51, p=0,001] e também houve interação entre os fatores [F(2,53)=8,82, p=0,0001]. Houve efeito do momento em que foi realizada a coleta [F(3,159)=74,63, p=0,0001], interação entre o tempo de coleta e grupo [F(3,159)=5,51, p=0,004] e interação entre o tempo e dieta [F(6,159)=3,38, p=0,004]. Houve interação geral entre os fatores [F(6,159)=3,72, p=0,002]. O teste *a posteriori* da interação geral, indicou que imediatamente após o teste, o grupo EPN-dieta regular apresentou menor liberação de CORT quando comparado com os respectivos animais controle (p=0,001). Os animais alimentados com as dietas de peixe e coco também tiveram redução das concentrações de CORT em relação ao grupo controle-dieta regular, respectivamente (p=0,002 e p=0,0001). Este resultado foi mantido nos 20 minutos após o teste (EPN-dieta regular x controle, p=0,004; controle-dieta regular x dieta coco, p=0,002; controle-dieta regular x dieta peixe, p=0,014, Gráfico 14).

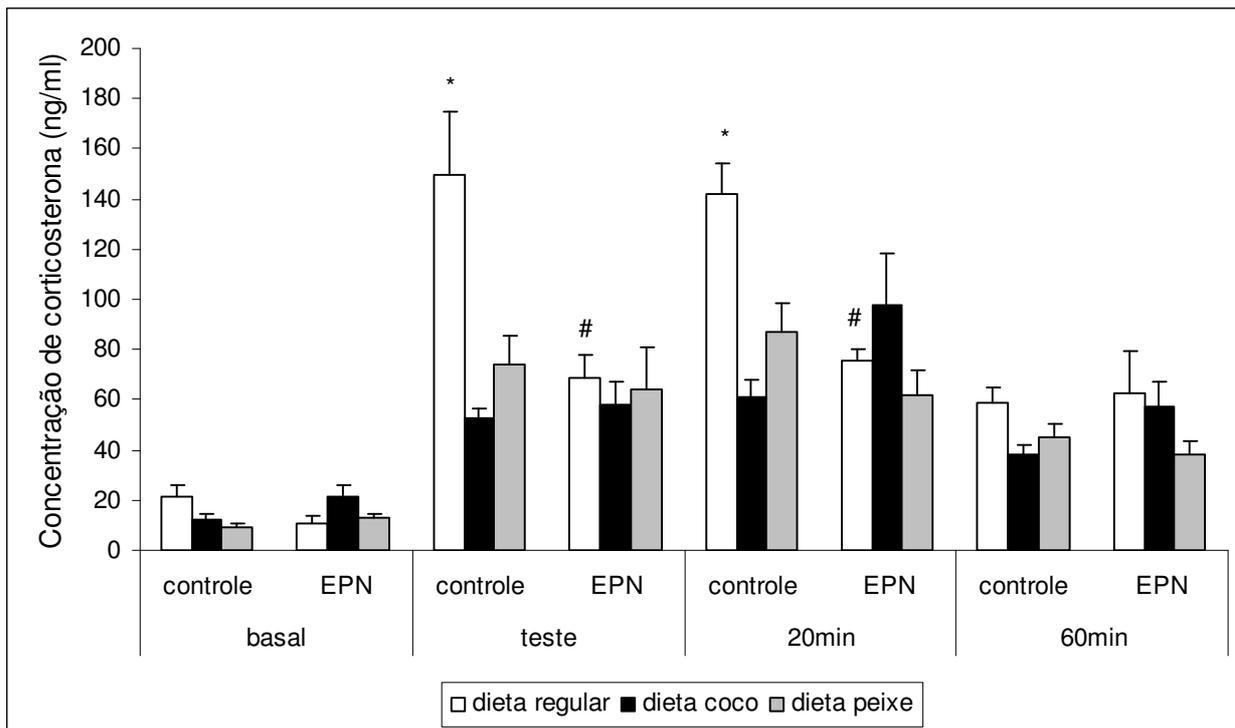


Gráfico 14 - Média±EPM da concentração de CORT basal e após a exposição ao TNF de machos (n=9-11). Newman-Keuls * p<0,05 representa a diferença entre dieta regular x coco e peixe; # p<0,05 representa a diferença entre CTL x EPN dieta regular.

DISCUSSÃO

Peso corporal, consumo de ração, tamanho da ninhada e concentrações de corticosterona materna

Os resultados do presente estudo mostraram que o estresse pré-natal causou menor ganho de peso em ratas durante a prenhez em comparação ao grupo controle. Além disso, os animais alimentados com dieta regular ou suplementados com óleo de peixe ganharam menor peso em relação ao grupo sob dieta suplementada com gordura de coco. Durante a amamentação, o grupo suplementado com dieta de coco continuou a ganhar peso em relação aos outros grupos. Entretanto, o grupo EPN suplementado com gordura de coco apresentou menor ganho de peso em relação ao grupo controle sob a mesma dieta, sugerindo que o estresse prejudicou o ganho de peso em animais sob dieta de coco. Alguns estudos mostram que dietas elevadas em gordura contendo uma mistura de óleo de coco e milho quando associadas ao estresse de restrição, não previnem a inibição na ingestão de comida e a perda de peso causado pelo estresse em ratos machos adultos (Harris et al., 1998; Zhou et al., 2001). Outra pesquisa mostrou que dieta elevada em óleo de peixe não previne a hipofagia e a perda de peso em ratos machos adultos submetidos ao estresse de restrição ou privação de sono, mas exagera os efeitos negativos do estresse sobre o peso corporal em privados de sono. Além disso, o óleo de peixe sozinho reduz a massa de gordura corporal (Papakonstantinou et al., 2003). Alguns estudos sugerem que o mecanismo de ação do óleo de peixe parece depender do tipo de estresse, sendo que o estresse psicológico poderia anular os benefícios deste tipo de óleo (Mills and Ward, 1986; Mills and Prkachin, 1993).

Em camundongos prenhes, o estresse de restrição aplicado duas vezes ao dia, causa redução na ingestão de água e comida, resultando em ganho de peso reduzido

(Ward and Wainwright, 1988). Segundo estes autores, procedimentos estressantes poderiam alterar o padrão de consumo diário e/ou prejudicar a conversão de calorias alimentares em ganho de peso como reação ao estresse. No nosso estudo, não foi possível medir o consumo de ração dos animais durante a prenhez, pois as ratas foram mantidas agrupadas em 2 ou 3 animais por caixa para evitar o efeito prejudicial do isolamento, que poderia atuar como uma variável confundidora.

No entanto, após o nascimento, houve um aumento significativo no consumo de ração ao longo das semanas em todos os grupos, porém o consumo de ração suplementada com óleo de peixe e gordura de coco foi significativamente menor ao de dieta regular. Alguns estudos mostram uma redução na ingestão de dietas elevadas em gordura que normalmente não afeta o peso dos animais que é compensado pela ingestão calórica aumentada, o que explicaria o aumento de peso no grupo suplementado com gordura de coco (Silveira, Limãos, Nunes, 1995; Wohlers et al., 2003).

Poucos estudos investigaram o efeito de uma dieta elevada em gordura durante a prenhez ou período de lactação. Trottier et al. (1998), mostram que dietas elevadas em gordura não influenciam a ingestão nem o peso de ratas prenhez durante a amamentação. Outro estudo verifica que ratos submetidos ao estresse psicossocial (exposição ao predador sem contato físico) apresentam perda de peso independentemente se a dieta tem baixo ou alto teor de gordura (Baran et al., 2005).

Com relação aos efeitos do EPN ao longo da gestação e amamentação, os resultados são controversos. Alguns estudos não encontram alterações no peso corporal ao longo da prenhez ou mudanças na ingestão alimentar (Burlet et al., 2005; Van den Hove et al., 2005; Mueller e Bale, 2006), enquanto outros relatam perda significativa de peso no final da prenhez e/ou da amamentação (Nishio et al., 2001;

Morley-Fletcher et al., 2003a; Hougaard et al., 2005; Van den Hove et al., 2006; D'Mello e Liu, 2006). Esses resultados poderiam ser consequência das diferentes linhagens (ratos Fischer 344, Sprague-Dawley, Wistar) ou espécie (camundongo x rato), e/ou do tipo de estressor utilizado, como a restrição com ou sem luz, som, natação e administração de dexametasona.

O tamanho da ninhada não foi afetado pelo estresse ou pelas dietas, embora o peso das mães tenha sido influenciado pelo EPN e pelo tipo de dieta. Estes dados estão de acordo com outros estudos mostrando os efeitos do EPN sobre a mãe e a prole (Morley-Fletcher et al., 2003a; Smith et al., 2004; Patin et al., 2004; Van den Hove et al., 2005, 2006; D'Mello e Liu, 2006).

Nossos dados sobre a CORT materna durante a prenhez demonstram que o grupo EPN apresentou maior concentração de CORT quando comparado ao controle no primeiro e no último dias do estresse de restrição. Esses dados concordam com estudos anteriores que mostram a ausência de adaptação dos animais ao estresse (D'Mello e Liu, 2006; Zagron e Weinstock, 2006).

Desenvolvimento de filhotes machos e fêmeas

Muitos estudos têm mostrado o efeito do estresse pré-natal na idade adulta; porém poucos exploram os efeitos do estresse pré-natal e/ou de fatores nutricionais sobre o desenvolvimento da prole nas primeiras semanas de vida (Suchecki e Palermo, 1991; Drago, Di Leo, Giardina, 1999; Meek, Burda, Paster, 2000; Patin et al., 2004; Burlet et al., 2005), especialmente sobre o reflexo e o comportamento motor, que são considerados importantes para sobrevivência (Barlow, Knight, Sullivan, 1978; Fride e Weinstock, 1984).

Nossos resultados mostraram que o reflexo postural de machos e de fêmeas não foi alterado pelo EPN, mas o tipo de dieta influenciou este comportamento. Os filhotes machos do grupo controle suplementados com óleo de peixe demoraram mais para endireitar o corpo no 1º dia de vida do que o grupo controle-dieta regular, enquanto que o grupo EPN-dieta regular apresentou uma tendência a retardar esse comportamento em relação ao seu grupo controle. Nas fêmeas, a dieta suplementada com gordura de coco reduziu a duração do reflexo em relação às dietas regular e óleo de peixe. Alguns estudos encontraram atraso na maturação do reflexo postural e no desenvolvimento motor de animais EPN (Meek, Burda, Paster, 2000; Patin et al., 2004) enquanto que outros não encontraram diferença entre animais estressados pré-natalmente e controle (Sobrian, 1977; Secoli e Teixeira, 1998). O efeito deletério do estressor dependeria do estágio de desenvolvimento do feto e seria mais acentuado no início da ontogênese do sistema nervoso central (Patin et al., 2004). Além disso, Fride e Weinstock (1984) demonstraram que o mesmo estressor resultaria em efeitos opostos sobre o desenvolvimento, dependendo do horário de sua aplicação.

O EPN diminuiu o peso de filhotes machos e fêmeas ao nascer. Essa redução no peso foi mantida até o 21º dia de vida, sendo que este prejuízo foi prevenido nos animais cujas mães receberam as dietas suplementadas com gordura de coco e óleo de peixe quando comparado com o grupo dieta regular. Hauser, Feldom, Pryce, (2006) relataram redução do peso ao nascer em machos e fêmeas expostas à dexametasona no período pré-natal. Segundo esses autores, a CORT teria uma ação inibitória sobre a síntese de DNA em células em divisão e, portanto, sobre o crescimento somático. Burlet et al. (2005) também encontraram redução do peso ao nascer e retardo do crescimento dos filhotes até o desmame que não variou com o gênero. Neste estudo, houve uma correlação negativa entre o peso e o reflexo postural, ou seja, quanto

menor o peso maior o tempo que o animal levou para endireitar o corpo. Além disso, os autores demonstraram que a redução no peso dos filhotes reflete um atraso no crescimento intra-uterino pelo bloqueio do ganho de peso na mãe causado pela injeção de dexametasona.

A atividade locomotora também foi influenciada pelo EPN e pela dieta suplementada com gordura de coco, que causaram aumento da locomoção independente do gênero. Em fêmeas, este comportamento foi prevenido pela dieta suplementada com óleo de peixe. Em camundongos o estresse pré-natal resulta em maior atividade exploratória no 12º dia de vida (Meek, Burda, Paster, 2000). Outros estudos, entretanto, encontraram redução da locomoção (Patin et al, 2004; Emack et al., 2008). Os estudos sobre os efeitos do EPN sobre a locomoção e comportamento exploratório são contraditórios devido à variabilidade de procedimentos entre os estudos, tais como método para mensurar a locomoção, tipo de EPN, idade dos animais ao serem testados e período da prenhez em que o estresse é aplicado (Kofman, 2002).

A dieta não prejudicou o crescimento dos filhotes , ao contrário, preveniu os efeitos deletérios do EPN sobre o peso corporal. Como as duas dietas apresentaram efeitos semelhantes, aventamos a hipótese de que estes seriam decorrentes do teor de gordura adicionada ou de efeitos biológicos semelhantes e que necessitam ser investigados. De acordo com Venna et al. (2009), subtipos de PUFA n-3 poderiam ser mais importantes para os efeitos benéficos do que seus derivados, ou mesmo do que outros tipos de ácidos graxos estejam implicados.

Muitos estudos mostram que algumas manipulações podem reverter ou prevenir os efeitos prejudiciais do EPN tais como o *handling* neonatal, cuidados maternos, ambiente enriquecido (Meaney et al., 1988; Maccari et al., 1995; Drago, Di Leo,

Giardina, 1999; Weinstock, 2002; Morley-Fletcher et al., 2003a). Segundo Papakonstatinou et al. (2003) a nutrição desempenharia um papel importante para aumentar os mecanismos adaptativos e melhorar a resposta ao estresse. Por outro lado, nosso estudo encontrou efeito prejudicial da suplementação com óleo de peixe sobre o reflexo postural e abertura dos olhos em machos, indicando um retardo na maturação sensorial. A suplementação com gordura de coco também teve efeito similar ao EPN sobre a locomoção. Este resultado, embora inesperado, está de acordo com outros estudos que mostram efeitos prejudiciais de dietas suplementadas com óleo de peixe sobre a taxa de crescimento e do desenvolvimento psicomotor em ratos e camundongos. Esse prejuízo seria consequência da redução de AA e sugere a importância do equilíbrio entre DHA/AA na alimentação materna (Amusquivar et al., 2000; Fountain et al., 2008; van Goor et al., 2008). Além disso, é possível que os mecanismos relacionados com a resposta ao estresse estejam envolvidos, pois há estudos mostrando que dietas elevadas em gordura influenciam a atividade do eixo HPA (Tannenbaum et al., 1997; Trottier et al., 1998) e que dietas elevadas em n-3 aumentam a ansiedade materna durante a amamentação (Fountain et al., 2008). Alguns estudos sugerem que os PUFAs, especialmente o DHA, promovem a maturação neuronal e sensorial em crianças (Das, 2003; Carlson, 2009), sendo que sua deposição dependente da quantidade oferecida na dieta durante a gestação e/ou lactação (Amusquivar et al., 2000; Broadhurst et al., 2002; van Goor et al., 2008). Não encontramos estudos avaliando os parâmetros aqui relatados com gordura de coco.

Comportamento de machos adultos

O EPN causou redução no peso de machos adultos quando comparados aos

controle. O peso baixo ao nascer está associado com aumento da susceptibilidade ao estresse e com depressão na vida adulta (Gale e Martyn, 2004). Entretanto, quando os animais foram avaliados no teste da natação forçada, um modelo animal de depressão, encontrou-se redução significativa no tempo de imobilidade em machos adultos EPN. Inversamente, o comportamento de natação foi significativamente aumentado no grupo EPN, mostrando que o mesmo causou um efeito tipo antidepressivo em machos. Embora as relações entre a imobilidade observada no TNF e o comportamento tipo-depressivo não sejam claras, os estudos sugerem que haveria alguma característica comum entre a depressão em humanos e este comportamento do rato (Weinstock, 2001). O tratamento com muitas classes de antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade neste teste e em animais submetidos ao EPN (Morley-Fletcher et al., 2004, 2003b; Porsolt et al., 1978).

Os efeitos de EPN sobre o comportamento tipo-depressivo parecem ser controversos. Muitos estudos usando paradigmas de estresse pré-natal mostram aumento no tempo de imobilidade e uma correlação positiva entre este comportamento e o aumento na liberação de CORT (Maccari e Morley-Fletcher, 2007; Morley-Fletcher et al., 2003b; Alonso et al., 1991). Outros estudos não encontram nenhum efeito do EPN sobre o comportamento tipo-depressivo em machos ou fêmeas (Frye e Wawrzycki, 2003; Van den Hove et al., 2005). A atividade motora foi avaliada no campo aberto e os machos não mostraram mudanças na ambulação.

Em relação às concentrações plasmáticas de CORT, nossos resultados mostraram que imediatamente após o teste, o grupo EPN-dieta regular apresentou menor liberação de CORT quando comparado ao controle. As dietas de peixe e coco também reduziram a liberação de CORT em relação ao grupo controle-dieta regular. Não constatamos diferenças no peso das adrenais. Van den Hove et al. (2005)

encontraram redução nas concentrações de CORT em resposta ao estresse em animais EPN quando comparados ao controle. Segundo esses autores, um efeito protetor ou adaptativo do EPN deveria ser considerado. Além disso, no nosso estudo é importante ressaltar que nossos animais foram acompanhados durante o período de amamentação. Alguns estudos têm mostrado que algumas manipulações pós-natais poderiam reverter ou abolir os efeitos de EPN, tal como o *handling* neonatal, a adoção e o ambiente enriquecido bem como tratamento farmacológico com diazepam (Lemaire et al., 2006; Morley-Fletcher et al., 2003a; Secoli e Teixeira, 1998; Drago, Di Leo, Giardina, 1999; Maccari et al., 1995).

Dietas contendo PUFA atenuam ou bloqueiam os efeitos comportamentais e bioquímicos causados pela administração intracerebroventricular de IL-1 em animais submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um teste de ansiedade (Song et al., 2003). Neste estudo, dietas com EPA atenuaram ou bloquearam o aumento de CORT induzida pela administração de IL-1 β . Esses dados sugerem que os PUFAs parecem diminuir a resposta ao estresse, auxiliando na manutenção da integridade do eixo HPA.

Alguns estudos têm demonstrado que a suplementação com n-3 previne o comportamento tipo-depressivo em ratos adultos submetidos ao TNF (Venna et al., 2009; Huang et al., 2008; Carlezon et al., 2005) e quando combinado com imipramina potencializa seu efeito (Venna et al., 2009). Especificamente, Naliwaiko et al. (2004) mostraram que a suplementação com n-3 durante a gestação, lactação e idade adulta produziu efeito antidepressivo. Recentemente, esses autores mostraram que independente do período em que a suplementação é realizada (gestação e lactação ou após o desmame) o n-3 tem um efeito benéfico, prevenindo o desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo (Ferraz et al., 2008). Por outro lado, um estudo com tratamento agudo e crônico com n-3 não conseguiu induzir qualquer alteração no

comportamento de animais submetidos ao TNF (Shaldubina et al., 2002). Nossos resultados concordam com esses achados comportamentais, e mostram que as dietas com gordura de coco e óleo de peixe per SESI só, bem como o EPN, reduzem a liberação de CORT. Além disso, o swimming foi aumentado no grupo tratado com dieta de peixe enquanto o climbing foi reduzido neste mesmo grupo em relação à dieta controle. Venna et al. (2009) também encontraram aumento no swimming e no climbing. Portanto, os dados da literatura parecem ser controversos quanto aos efeitos de n-3, mas muitos fatores poderiam explicar as divergências entre os resultados encontrados, como por exemplo, a maneira como a suplementação é administrada, a origem do PUFA usado e a quantidade de outros tipos de PUFA contidos no óleo ou dieta. Em um estudo com modelo de epilepsia foi mostrado que o ALA seria importante para os efeitos comportamentais e não seus derivados como o DHA ou EPA (Porta et al., 2008).

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o estresse pré-natal prejudica o desenvolvimento e o crescimento intra-uterino dos filhotes, independentemente do gênero. A dieta rica em gordura per se, influenciou o desenvolvimento dos filhotes e o seu peso durante a lactação, além de prevenir algumas das alterações causadas pelo estresse pré-natal em filhotes machos e fêmeas. Os machos parecem ser mais susceptíveis às alterações induzidas pelo estresse pré-natal. Na idade adulta ambas as manipulações, estresse pré-natal e as dietas suplementadas, influenciaram a resposta de corticosterona, reforçando a idéia de que o estresse pré-natal causa conseqüências negativas, a longo prazo, em animais experimentais. Dessa maneira, estes dados corroboram nossa hipótese de que a suplementação com ômega-3 pode prevenir alguns dos efeitos prejudiciais do estresse pré-natal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGID, O.; KOHN, Y.; LERER, B. Environmental stress and psychiatric illness. **Biomed Pharmacother.** 54(3):135-145, 2000.
- ALONSO, S.J.; AREVALO, R.; AFONSO, D.; RODRIGUES, M. Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. **Physiol Behav**, 50: 511-17, 1991.
- AMUSQUIVAR, E.; RUPÉREZ, F.J.; BARBAS, C.; HERRERA, E. Low arachidonic acid rather than α -tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. **J. Nutr.**, 130: 2855-2865, 2000.
- ANDERSON, G.L. Developmental sensitivity of the brain to dietary n-3 fatty acids. **J Lipid Res**, 35: 105-11, 1994.
- ARBORELIUS, L.; OWENS, M.J.; PLOTSKY, P.M.; NEMEROFF, C.B. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **J Endocrinol.**, 160(1):1-12, 1999.
- BAEZ, M.; VALOSIN, M. Corticosterone influences forced swimming immobility. **Pharmacol Biochem Behav**, 49: 729-36, 1994.
- BARAN, S.E.; CAMPBELL, A.M.; KLEEN, J.K.; FOLTZ, C.H.; WRIGHT, R.L.; DIAMOND, D.M.; CONRAD, C.D. Combination of high fat diet and chronic stress retracts hippocampal dendrites. **Neuroreport**, 16(1): 39-43, 2005.
- BARBAZANGES, A.; PIAZZA, P.V.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. **J Neuroscience**, 16(12): 3943-3949, 1996.
- BARKER, D.J. Intrauterine programming of adult disease. **Mol. Med. Today**, 1, 418-423, 1995.

- BARLOW, S.M., KNIGHT, A.F., SULLIVAN, S.M. Delay in postnatal development growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. **Teratology**, 18: 211-218, 1978.
- BORSONELO, E.C.; GALDUROZ, J.C.F.; SUCHECKI, D.; CALIL, H.M. The influence of n-6 fatty acid supplemented diet on the effect of imipramine in a animal model of depression. **Pharmacol, Biochem Behav**, 86: 113-116, 2007.
- BORSONELO, E.C.; GALDURÓZ, J.C.F. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions. **Prostaglandin, Leuk and Essential Fatty Acids**, 78: 237-245, 2008.
- BOURRE, J.M.; BONNEIL, M.; CLÉMENT, M.; DUMONT, O.; DURAND, G.; LAFONT, H.; NALBONE, G. & PICIOTTI, M. Function of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. **Prostaglandins, Leuk and essential fatty acids**, 48: 5-15, 1993.
- BRESLAU, N.; DAVIS, G.C.; PETERSON, E.L.; SCHULTZ, L. Psychiatric sequelae of posttraumatic stress disorder in women. **Arch Gen Psychiatry** 54:81– 87, 1997.
- BROADHURST, C.L.; WANG, Y.; CRAWFORD, M.A.; CUNNANE, S.C.; PARKINGTON, J.E.; SCHMIDT, W.F. Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African *Homo sapiens*. **Comparative Biochem and Physiology Part B**, 131: 653-673, 2002.
- BROWN, G.W. Life events and affective disorder: Replications and limitations. **Psychosom Med**, 55:248 –259, 1993.
- BURLET, G.; FERNETTE, B.; BLANCHARD, S.; ANGEL, E.; TANKOSIC, P.; MACCARI, S.; BURLET, A. Antenatal glucocorticoids blunt the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of neonates and disturb some behaviors in juveniles. **Neuroscience.**, 133(1):221-30, 2005.

- BUTLER, P.D.; WEISS, J.M.; STOUT, J.C.; NEMEROFF, C.B. Corticotrophin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. **J Neurosci**, 10: 176-183, 1990.
- CARLEZON Jr, W.A.; MAGUE, S.D.; PAROW, A.M.; STOLL, A.L.; COHEN, B.M.; RENSHAW, P.F. Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. **Biol. Psychiatry**, 57: 343–350, 2005.
- CARLSON, S.E. Docosahexaenoic acid supplementation in pregnancy and lactation. **Am. J. Clin. Nutr**, 89: 678S-84S, 2009.
- CATALANI, A.; MARINELLI, M.; SCACCIANOCE, S.; NICOLAI, R.; MUSCOLO, L.A.; PORCU, A.; KORANYI, L.; PIAZZA, P.V.; ANGELUCCI, L. Progeny of mothers drinking corticosterone during lactation has lower stress-induced corticosterone secretion and better cognitive performance. **Brain Res**, 624: 209-215, 1993.
- CATALANI, A.; CASOLINI, P.; SCACCIANOCE, S.; PATACCHIOLI, F.R.; SPINOZZI, P.; ANGELUCCI, L. Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny. **Neurosci**, 100: 319-325, 2000.
- CHALON, S.; DELION-VANCASSEL, S.; BELZUNG, C.; GUILLOTEAU, D.; LEGUISQUET, A-M.; BESNARD, J-C.; DURAND, G. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. **J. Nutr**, 128: 2512-2519, 1998.
- CHALON, S.; VANCASSEL, S.; ZIMMER, L.; GUILLOTEAN, D.; DURAND, G. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission, **Lipids**, 36(9): 937-44, 2001.
- CHROUSOS, G.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders, **JAMA**, 267: 1244-1252, 1992.

- D'MELLO, A.P.; LIU, Y. Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring. **Psychoneuroendocrinol**, 31: 395-406, 2006.
- DAS, U.N. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of brain and memory. **Nutrition**, 19: 62-65, 2003.
- DRAGO, F.; Di Leo, F.; GIARDINA, L. Prenatal stress induces body weight deficit and behavioural alterations in rats: the effect of diazepam. **Eur. Neuropsychopharmacol**, 9: 239-245, 1999.
- DUGOVIC, C.; MACCARI, S.; WEIBEL, L.; TUREK, F.W.; VAN REETH, O. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. **J Neurosci**, 19: 8656-8664, 1999.
- EDWARDS, C.R.; BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.S.; SECKL, J.R. 11 beta-hydroxysteroid-dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects. **Steroids**, 61: 263-269, 1996.
- EDWARDS, R.; PEET, M.; SHAY, J.; HORROBIN, D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. **J. Affective Disorders**, 48:149-155, 1998.
- EMACK, J.; KOSTAKI, A.; WALKER, C-D.; MATTHEWS, S.G. Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal function in juvenile offspring. **Hormones and Behavior**, 54: 514-520, 2008.
- FEDOROVA, I.; SALEM Jr, N. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. **Prostaglandin, Leuk and Essential Fatty Acids**, 75: 271-289, 2006.
- FERRAZ, A.C.; KISS, A.; ARAÚJO, R.L.F.; SALLES, H.M.R.; NALIWAIKO, K.; PAMPLONA, J.; MATHEUSSI, F. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins, Leuk and Essential Fatty Acids**, 78: 183–188, 2008.

- FOUNTAIN, E.D.; MAO, J.; WHYTE, J.J.; MUELLER, K.E.; ELLERSIECK, M.R.; WILL, M.J.; ROBERTS, R.M.; MACDONALD, R.; ROSENFELD, C.S. Effects of diets enriched in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on offspring sex-ratio and maternal behavior in mice. **Biol. Reproduction**, 78: 211-217, 2008.
- FREEMAN, M.P. Omega-3 fatty acids in psychiatry: a review. **Ann Clin Psychiat**, 12: 159-165, 2000.
- FREITAS, J.J.; KIETZER, K.S. Ácidos graxos e sistema nervoso. In: **Entendo a gordura: Os ácidos graxos**. CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K. & PROCÓPIO, J., Manole, São Paulo, 2002, p.467-488.
- FRIDE, E.; WEINSTOCK, M. The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. **Dev Psychobiol**, 17(6): 651-60, 1984.
- FRYE, C.A.; WAWRZYCKI, J. Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. **Horm Behav**, 44: 319-326, 2003.
- GALE, C.R.; MARTYN, C.N. Birth weight and later risk of depression in a national birth cohort. **Br. J. Psychiatry**, 184: 28-33, 2004.
- GITAU, R.; CAMERON, A.; FISK, N.M.; GLOVER V. Fetal exposure to maternal cortisol. **Lancet**, 352: 707-708, 1998.
- GREEN, P.; YAVIN, E. Mechanisms of docosahexaenoic acid accretion in the fetal brain. **J Neurosci Res**, 52: 129-36, 1998.
- GREEN, P.; GLOZMAN, S.; KAMENSKY, B.; YAVIN, E. Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. **J.Lipid Res**, 40: 960-966, 1999.
- GREEN, P.; YAVIN, E. Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. **Lipids**, 31: 859-865, 1996.

- GROOME, L.J.; SWIBER, M.J.; BENTZ, L.S.; HOLLAND, S.B.; ATTERBURY, J.L. Maternal anxiety during pregnancy: effect on fetal behavior at 38-40 weeks' gestation. **J Dev Behav Paediatr**, 16: 391-6, 1995.
- HAAG, M. Essential fatty acids and the brain. **Can J Psychiatry**, 48(3): 195-203, 2003.
- HABID, K.E.; GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology of stress. **Endocrinol. Metab. Clin. N. Am**, 30: 695-728, 2001.
- HARRIS, R.B.S.; ZHOU, J.; YOUNGBLOOD, B.D.; RYBKIN, I.I.; SMAGIN, G.N.; RYAN, D.H. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. **Am J Physiol**, 275: R1928-R1938, 1998.
- HAUSER, J.; FELDON, J.; PRYCE, C.R. Prenatal dexamethasone exposure, postnatal development, and adulthood prepulse inhibition and latent inhibition in Wistar rats. **Behav Brain Res**, 175(1):51-61, 2006.
- HEIM, C.; NEMEROFF, C.B. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. **Biol. Psychiatr**, 46(11): 1509-22, 1999.
- HEIM, C.; NEMEROFF, C.B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biol Psychiatry**, 49(12):1023-39, 2001.
- HEIM, C.; PLOTSKY, P.M.; NEMEROFF, C.B. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. **Neuropsychopharmacol**, 29(4):641-8, 2004.
- HIBBELN, J. Fish consumption and major depression. **Lancet**, 351: 1213, 1998.
- HOLSBOER, F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. **J Affect Disord**, 62(1-2):77-91, 2001.

- HORROBIN, D.F.; BENNETT, C.N. New gene targets related to schizophrenia and other psychiatric disorders: enzymes, binding proteins and transport proteins involved in phospholipid and fatty acid metabolism. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 60(3):141-67, 1999.
- HORROCKS, L.A.; YEO, Y.K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacol Res**, 40(3): 211-225, 1999.
- HOUGAARD, K.S.; ANDERSEN, M.B.; KJAER, S.L.; HANSEN, A.M.; WERGE, T.; LUND, S.P. Prenatal stress increase vulnerability to life events: Comparison with the effects of prenatal dexamethasone. **Developmental Brain Res**, 159: 55-63, 2005.
- HUANG, S.Y.; YANG, H.T.; CHIU, C.C.; PARIANTE, C.M.; SU, K.P. Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. **J. Psychiatr. Res**, 42: 58-63, 2008.
- HUIZINK, A.C.; MULDER, E.J.H.; BUITELAAR, J.K. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? **Psychological Bull**, 130(1): 115-142, 2004.
- INNIS, S.M. The 1993 Borden Award Lecture. Fatty acid requirements of the newborn. **Can J Physiol Pharmacol**, 72: 1483-92, 1994.
- INNIS, S.M. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. **Brain Research**, 1237: 35-43, 2008.
- JUSTO, I.P., BORSONELO, E.C., GUERRA, A.B.G., CALIL, H.M. A survey on anxious and depressive complaints of Brazilian women. **J Affective Dis**, 102: 259-264, 2007.
- KENDLER, K.S.; NEALE, M.C.; KESSLER, R.C.; HEATH, A.C.; EAVES, L.J. Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin perspective. **Arch Gen Psychiatry**, 49:109-116, 1992.

- KOEHL, M.; BARBAZANGES, A.; Le MOAL, M.; MACCARI, S. Prenatal stress induces a phase advance of circadian corticosterone rhythm in adult rats which is prevented by postnatal stress. **Brain Res**, 759: 317-320, 1997.
- KOEHL, M.; DARNAUDERY, M.; DULLUE, J.; VAN REETH, O.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosterone receptors in adult rats of both gender. **J. Neurobiol**, 40: 302-315, 1999.
- KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, 26(4):457-70, 2002.
- LEMAIRE, V.; KOEHL, M.; LE MOAL, M.; ABROUS, D.N. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 97(20): 11032-11037, 2000.
- LEMAIRE, V.; LAMARQUE, S.; LE MOAL, M.; PIAZZA, P-V.; ABROUS, D.N. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. **Biol Psychiatry**, 59: 786-792, 2006.
- LESAGE, J.; DEL-FAVERO, F.; LEONHARDT, M.; LOUVART, H.; MACCARI, S.; VIEAU, D.; DARNAUDERY, M. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. **J. Endocrinol**, 181: 291-296, 2004.
- MACCARI, S.; DARNAUDERY, M.; MORLEY-FLETCHER, S.; ZUENA, A.R.; CINQUE, C.; VAN REETH, O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. **Neurosci. Biobehav Rev**, 27(1-2):119-127, 2003.
- MACCARI, S.; PIAZZA, P.V.; KABBAJ, M.; BARBAZANGES, A.; SIMON, H.; LE MOAL, M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. **J. Neuroscience**, 15: 110-116, 1995.

- MACCARI, S.; MORLEY-FLETCHER, S. Effects of prenatal stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. **Psychoneuroendocrinol**, 32: S10-S15, 2007.
- MAES, M.; CHRISTOPHE, A.; COSYNS, P.; DESNYDER, R.; MELTZER, H.Y. Fatty acid composition in major depression: decreased omega 3 fractions in cholesteryl esters and increased C20:4 omega 6/C20:5 omega 3 ratio in cholesteryl esters and phospholipids. **J Affect Disord**, 38(1): 35-46, 1996.
- MAES, M.; CHRISTOPHE, A.; DELANGHE, J.; ALTAMURA, C.; NEELS, H.; MELTZER, H.Y. Lowered omega-3 polyunsaturated acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. **Psychiatry Res**, 85(3): 275-91, 1999.
- MAIRESSE, J.; LESAGE, J.; BRETON, C.; BREANT, B.; HAHN, T.; DARNAUDERY, M.; DICKSON, S.L.; SECKL, J.; BLONDEAU, B.; VIEAU, D.; MACCARI, S.; VILTART, O. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, 292: E1526-1533, 2007.
- MARTEINSDOTTIR, I.; HORROBIN, D.F.; STENFORS, C.; THEODORSSON, E. & MATHÉ, A.A. Changes in dietary fatty acids alter phospholipid fatty acid composition in selected regions of rat brain. **Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat**, 22: 1007-1021, 1998.
- McCAULEY, J.; KERN, D.E.; KOLODNER, K.; DILL, L.; SCHROEDER, A.F.; DeCHANT, H.K.; RYDEN, J.; DEROGATIS, L.R.; BASS, E.B. Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse. **JAMA**, 277: 1362-1368, 1997.
- McEWEN, B.S. Physiology and neurobiology of stress adaptation: central role of the brain. **Physiol. Rev.**, 87: 873-904, 2007.
- McEWEN, B.S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu. Rev. Neurosci**, 22: 105-122.

- MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; VAN BERKEL, C.; BHATNAGAR, S.; SAPOLSKY, M.
Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the
hippocampus. **Science**, 239: 766-768, 1988.
- MEEK, L.R.; BURDA, K.M.; PASTER, E. Effects of prenatal stress on development in
mice: maturation and learning. **Physiol Behav**, 71(5):543-9, 2000.
- MEIER, A. Child psychiatric sequelae of maternal war stress. **Acta Psychiatr. Scand**,
72: 505-511, 1985.
- MILLS, D.E.; PRKACHIN, K.M. Psychological stress reverses antiaggregatory effects of
dietary fish oil. **J Behav Med**, 16 (4): 403-12, 1993.
- MILLS, D.E.; WARD, R.P. Effects of eicosapentaenoic acid (20:5 omega-3) on stress
reactivity in rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, 182 (1): 127-31, 1986.
- MITCHELL, J.B.; MEANEY, M.J. Effects of corticosterone on response consolidation
and retrieval in the forced swim test. **Behav Neurosci**, 105: 798-803, 1991
- MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition
on the hippocampal formation. **Neurosci. Biobehav. Rev**, 26: 471-483, 2002.
- MORLEY-FLETCHER, S.; DARNAUDÉRY, M.; KOEHL, M.; CASOLINI, P.; VAN
REETH, O.; MACCARI, S. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the
forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. **Brain Res**, 989:
246-251, 2003b.
- MORLEY-FLETCHER, S.; DARNAUDÉRY, M.; MOCAER, E.; FROGER, N.;
LANFUMEY, L.; LAVIOLA, G.; CASOLINI, P.; ZUENA, A.R.; MARZANO, L.;
HAMON, M.; MACCARI, S. Chronic treatment with imipramine reverses immobility
behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT_{1A} receptor mRNA
in prenatally stressed rats, **Neuropharmacol**, 47: 841-847, 2004.

- MORLEY-FLETCHER, S.; REA, M.; MACCARI, S.; LAVIOLA, G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. **Eur J Neuroscience**, 18: 3367-3374, 2003a.
- MUELLER, B.R.; BALE, T.L. Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. **Physiol Behav**, 88: 605-614, 2006.
- MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 349:1498-1504, 1997.
- NALIWAIKO, K.; ARAUJO, R.L.; DA FONSECA, R.V.; CASTILHO, J.C.; ANDREATINI, R.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H.; MARTINS, E.F.; CURI, R.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A.C. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? **Nutr Neurosci**, 7(2):91-9, 2004.
- NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, 34(1):13-25, 2002.
- NISHIO, H.; KASUGA, S.; USHIJIMA, M.; HARADA, Y. Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats – sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats. **Int J Devl Neuroscience**, 19: 37-45, 2001.
- PAPAKONSTANTINO, E.; RYAN, D.H.; HARRIS, R.B. Dietary fish oil does not protect rats exposed to restraint or sleep deprivation stress. **Physiol Behav**, 78(4-5):759-65, 2003.
- PARIANTE, C.M. The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? **J Psychopharmacol**, 20(4 S):79-84, 2006.
- PATIN, V.; VINCENT, A.; LORDI, B.; CASTON, J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? **Dev Brain Res**, 149(2):85-92, 2004.

- PEET, M.; HORROBIN, D.F. A dose-ranging study of the effects of ethil-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. **Arch Gen Psychiatry**, 59: 913-919, 2002.
- PEET, M.; MURPHY, B.; SHAY, J.; HORROBIN, D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. **Biol. Psychiatry**, 43(5): 315-9, 1998.
- PETRAGLIA, F.; VOLPE, A.; GENAZZANI, R.; RIVIER, J.; SAWCHENKO, P.E.; VALE, W. Neuroendocrinology of the human placenta. **Front Neuroendocrinol**, 11: 6-37, 1990.
- PFISTER, H.P.; MUIR, J.L. Psychological stress and administered oxytocin during pregnancy: effect corticosterone and prolactin response in lactant rats. **Int. J. Neurosci**, 45: 91-99, 1989.
- PLOTSKY, P.M., OWENS, M.J., NEMEROFF, C.B. Psychoneuroendocrinology of depression:Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychiatr Clin North Am**, 21: 293–307, 1998.
- PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol**, 47: 379-391, 1978.
- PORTA, N.; BOURGOIS, B.; GALABERT, C.; LECOINTE, C.; CAPPY, P.; BORDET, R.; VALLÉE, L.; AUVIN, S. Anticonvulsivant effects of linolenic acid are unrelated to brain phospholipid cell membrane composition. **Epilepsia**, 50(1):65-71, 2009.
- POST, R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psychiatry**, 149:999 –1010, 1992.
- RATNAYAKE, W.M.N; HOLLYWOOD, R. Influence of diet on human milk fatty acid composition. Abstracts, **88th AOCs Annual Meeting and Expo**, 96-96 (Abstract), 1997.

- REZNIKOV, A.G.; NOSENKO, N.D.; TARASENKO, L.V. Prenatal stress and glucocorticoid effects on the developing gender-related brain. **J. Steroid Biochem Mol. Biol**, 69: 109-115, 1999.
- RHEES, R.W.; AL SALEH, H.N.; KINGHORN, E.W.; FLEMING, D.E.; LEPART, E.D. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. **Brain Res. Bull**, 50: 193-99, 1999.
- SALEM Jr, N.; WEGHER, B.; MENA, P.; UAUY, R. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 49-54, 1996.
- SANDMAN, C.A.; WADHWA, P.D.; CHIEZ-DEMET, A.; DUNKEL-SCHETTER, C.; PORTO, M. Maternal stress, HPA activity, and fetal-infant outcome. **Ann. N Y Acad Sci**, 814: 266-275, 1997.
- SHELL, L.M. Environmental noise and human prenatal growth. **Am J Physiol Anthropol**, 56: 63-70, 1981.
- SCHIEFERMEIER, M.; YAVIN, E. n-3 deficient and docosahexaenoic acid-enriched diets during critical periods of the development prenatal rat brain. **J. Lipid Res**, 43: 124-131, 2002.
- SECKL, J.R. Physiologic programming of the fetus. **Clin.Perinatol**, 25:939-962, 1998.
- SECKL, J.R.; MEANEY, M.J. Glucocorticoid programming. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 1032: 63-84, 2004.
- SECOLI, S.R.; TEIXEIRA, N.A. Chronic prenatal stress affects development and behavioral depression in rats. **Stress**, 2(4):273-80, 1998.
- SELIGMAN, M.E. Learned helplessness. **Annu. Rev. Med**, 23: 407-412, 1972.

- SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **Practitioner**, 163: 393-406, 1949.
- SHALDUBINA, A.; NEMETS, B.; BERSUDSKY, Y. Lack of effect of eicosapentaenoic acid in the Porsolt forced swimming test model of depression. **Acta Neuropsychiat**, 14: 203-206, 2002.
- SILVA, A.X.; LAVIALLE, F.; GENDROT, G.; GUESNET, P.; ALESSANDRI, J.M., LAVIALLE, M. Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. **J Neurochem**, 81: 1328-1337, 2002.
- SILVEIRA, V.L.F.; LIMÃOS, E.A.; NUNES, D.W. Participation of the adrenal gland in the anti-inflammatory effects of polyunsaturated diets. **Med Inflammation**, 4: 359-363, 1995.
- SMITH, J.W.; SECKL, J.R.; EVANS, A.T.; COSTALL, B.; SMYTHE, J.W. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. **Psychoneuroendocrinol**, 29: 227-244, 2004.
- SOBRIAN, S.K. Aversive prenatal stimulation: effects on behavioral, biochemical, and somatic ontogeny in the rat. **Dev Psychobiol**, 10(1):41-51, 1977.
- SOLBERG, L.C.; AHMADIYEH, N.; BAUM, A.E.; VITATERNA, M.H.; TAKAHASHI, J.S.; TUREK, F.W.; REDEI, E.E. Depressive-like behavior and stress reactivity are independent traits in a Wistar Kyoto x Fischer 344 cross. **Mol. Psychiat**, 8 (4): 423-433, 2003.
- SONG, C.; LI, X.; LEONARD, B.E.; HORROBIN, D.F. Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1 β -induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. **J. Lipid Res**, 44:1984-1991, 2003.
- SPECTOR, A.A. Essentiality of fatty acids. **Lipids**, 34:S1-3, 1999.

- STERLING, M.; EYER, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: **Handbook of life stress, cognition and health**. Fischer, S.; Reason, J. (Eds.), New York, 1988, pp. 629-649.
- STOHR, T.; SZURAN, T.; WELZL, H.; PLISKA, V.; FELDON, J.; PRICE, C.R. Lewis/Fischer rat strain differences in endocrine and behavioural responses to environmental challenge. **Pharmacol. Biochem. Behav**, 67: 809-819, 2000.
- STOHR, T.; SCHULTE WERMELING, D.; SZURAN, T.; PLISKA, V.; DOMENEY, A.; WELZL, H.; WEINER, I.; FELDON, J. Differential effects of prenatal stress in two inbred strains of rats. **Pharmacology, Biochem. Behav**, 59 (4): 799-805, 1998.
- SU, K.P.; HUANG, S.Y.; CHIU, C.C.; & SHEN, W.W. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. **Eur Neuropsychopharmacol**, 13: 267-271, 2003.
- SUCHECKI, D.; PALERMO NETO, J. Prenatal stress and emotional response of adult offspring. **Physiol Behav**, 49(3):423-6, 1991.
- SZYMANSKA, M.; BUDZISZEWSKA, B.; JAWORSKA-FEIL, L.; BASTA-KAIM, A.; KUBERA, M.; LESKIEWICZ, M.; REGULSKA, M.; LASON, W. The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats. **Psychoneuroendocrinol**, 34(6): 822-832, 2009.
- TAKEUCHI, T.; FUKUMOTO, Y. & HARADA, E. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. **Behav. Brain Res.**, 131: 193-203, 2002.
- TANNENBAUM, B.M.; BRINDLEY, D.N.; TANNENBAUM, G.S.; DALLMAN, M.F.; MCARTHUR, M.D.; MEANEY, M.J. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. **Am J Physiol**, 273(6 Pt 1):E1168-77, 1997.

- TANSKANEN, A.; HIBBELN, J.R.; HINTIKKA, J.; HAATAINEN, K.; HONKALAMPI, K.; VIINAMÄKI, H. Fish consumption, depression, and suicidality in a general population. (Letter to the editor) **Arch Gen Psychiatry**, 58: 512-13, 2001a.
- TANSKANEN, A.; HIBBELN, J.R.; TUOMILEHTO, J.; UUTELA, A.; HANKKALA, A.; VIINAMÄKI, H.; LEHTONEN, J.; VARTIAINEN, E. Fish consumption and depression symptoms in the population in Finland. **Psychiatr Serv**, 52: 529-531 2001b.
- TEIXEIRA, J.M.A.; FISK, N.M.; GLOVER, V. Association between maternal anxiety in pregnancy and increased uterine artery resistance index: cohort based study. **BMJ**, 318: 153-7, 1999.
- THRIVIKRAMAN, K.V.; SU, Y.; PLOTSKY, P.M. Patterns of Fos-Immunoreactivity in the CNS Induced by Repeated Hemorrhage in Conscious Rats: Correlations with Pituitary-Adrenal Axis Activity. **Stress**, 2: 145-158, 1997.
- TROTTIER, G.; KOSKI, K.G.; BRUN, T.; TOUFEXIS, D.J.; RICHARD, D.; WALKER, C.D.. Increased fat intake during lactation modifies hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness in developing rat pups: a possible role for leptin. **Endocrinology**, 139(9):3704-11, 1998.
- UAUY, R.; MENA, P.; WEGHER, B.; NIETO, S.; SALEM, N. Long chain polyunsaturated fatty acid formation in neonatos: effect of gestational age and intrauterine growth. **Pediatr res**, 47, 127-135, 2000.
- VALLÉE, M.; MAYO, W.; DELLU, F.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; MACCARI, S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **J. Neurosci**, 17: 2626-2636, 1997.
- VAN DEN HOVE, D.L.A.; BLANCO, C.E.; AENDEKERK, B.; DESBONNET, L.; BRUSCHETTINI, M.; STEINBUSCH, H.P.; PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H.W.M.

- Prenatal restraint stress and long-term affective consequences. **Develop neurosci**, 27: 313-320, 2005.
- VAN DEN HOVE, D.L.A.; STEINBUSCH, H.W.M.; SCHEEPENS, A.; VAN DE BERG, W.D.J.; KOOIMAN, L.A.M.; BOOSTEN, B.J.G.; PRICKAERTS, J.; BLANCO, C.E. Prenatal stress and neonatal rat brain development. **Neurosci**, 137: 145-155, 2006.
- VAN GOOR, S.A.; DIJCK-BROUWER, D.A.J.; FOKKEMA, M.R.; VAN DER IEST, T.H.; MUSKIET, F.A.J. Maternal and fetal brain contents of docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) at various essential fatty acid (EFA), DHA and AA dietary intakes during pregnancy in mice. **Prostaglandins, Leukot and Essential Fatty Acids**, 78: 159-169, 2008.
- VAN PRAAG, H.M. Can stress cause depression? **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 28(5):891-907, 2004.
- VÁSQUEZ, D.M. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinol**, 23 (7): 663-700, 1998.
- VENNA, V.R.; DEPLANQUE, D.; ALLET, C.; BELARBI, K.; HAMDANE, M.; BORDET, R. FUFAs induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinol**, 34: 199-211, 2009.
- WALKER, C-D.; DESCHAMPS, S.; PROULX, K.; TU, M.; SALZMAN, C.; WOODSIDE, B.; LUPIEN, S.; GALLO-PAYET, N.; RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Rev. Psychiat Neurosci**, 29(5): 364-382, 2004.
- WARD, G.R.; WAINWRIGHT, P.E. Reductions in maternal food and water intake account for prenatal stress effects on neurobehavioral development in B6D2F2 mice. **Physiology Behav**, 44: 781-786, 1988.

- WARD, I.L.; WEISZ, J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rats fetus and their mothers. **Endocrinol**, 84: 1135-1145, 1984.
- WEINSTOCK, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. **Prog. Neurobiology**, 65: 427-451, 2001.
- WEINSTOCK, M. Behavioral and neurohormonal sequelae of prenatal stress: a suggested model of depression. In: **Contemporary Issues in Modeling Psychopathology**. Myslobodsky, M.; Weiner, I. (Eds), Kluwer, Dordrecht, 2000, pp. 45-54.
- WEINSTOCK, M. Can the behaviour abnormalities induced by gestational stress in rats be prevented or reversed? **Stress**, 5(3): 167-176, 2002.
- WEINSTOCK, M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **Neurosci Biobehav Rev**, 21(1):1-10, 1997.
- WEINSTOCK, M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. **Neurosc. Biobehav. Rev**, 32: 1073-1086, 2008.
- WEINSTOCK, M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. **Brain, Behav and Immunity**, 19: 296-308, 2005.
- WILLIAMS, M.T.; DAVIS, H.N.; MCCREA, A.E.; HENNESSY, M.B. Stress during pregnancy alters the offspring hypothalamic, pituitary, adrenal, and testicular response to isolation on the day of weaning. **Neurotoxicology Teratol**, 21(6): 653-659, 1999.
- WILLIAMS, M.T.; DAVIS, H.N.; MCCREA, A.E.; HENNESSY, M.B. The distribution of radiolabeled corticotrophin-releasing factor in pregnant rats: an investigation of placental transfer to the fetuses. **Int. J. Dev. Neurosci**, 16: 229-234, 1998.
- WOHLERS, M.; NASCIMENTO, C.M.O.; XAVIER, R.A.N.; RIBEIRO, E.B.; SILVEIRA, V.L.F. Participation of corticosteroids and effects of indomethacin on the acute

inflammatory response of rats fed n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets. **Inflammation**, 27 (1): 1-7, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World health report, 2001. Mental Health: New understanding, New Hope, Geneva: WHO, 2001.

YEHUDA, S. Omega-6/omega-3 ratio and brain-related functions. **World Rev Nutr Diet**, 92:37-56, 2003.

YOUDIM, A.K.; MARTIN, A.; JOSEPH, A.J. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int. J. Devl Neuroscience**, 18: 383-399, 2000.

ZAGRON, G.; WEINSTOCK, M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. **Behavioural Brain Res**, 175: 323-328, 2006.

ZARROW, M.X.; PHILPOTT, J.E.; DENENBERG, V.H. Passage of 14C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. **Nature**, 226:1058-1059, 1970.

ZEISEL, S.H. Is maternal diet supplementation beneficial? Optimal development of infant depends on the mother's diet. **Am. J. Clin. Nutr**, 89:685S-687, 2009.

ZHOU, J.; SHI, M.X.; MITCHELL, T.D.; SMAGIN, G.N.; THOMAS, S.R.; RYAN, D.H.; HARRIS, R.B.S. Changes in rat adipocyte and liver glucose metabolism following repeated restraint stress. **Exp Biol Med**, 226 (4): 312-19, 2001.

ZIMMER, L.; VANCASSEL, S.; CANTAGREL, S.; BRETON, P.; DELAMANICHE, S.; GUILLOTEAU, D.; DURAND, G. & CHALON, S. The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. **Am J Clin Nutr**, 75: 662-667, 2002.

Abstract

Adequate development of the central nervous system depends on prenatal and postnatal factors. On one hand, prenatal stress (PNS) has been implicated in impaired development of the offspring. On the other hand, nutritional factors during pregnancy and lactation can influence fetal and postnatal growth. This study assessed the postnatal development of rat offspring exposed to PNS whose mothers were fed with different diets during pregnancy and lactation. Female Wistar rats were assigned to one of three groups: regular diet, diet supplemented with coconut fat or fish oil. When pregnancy was confirmed, they were distributed into control (CTL) or PNS (daily restraint stress during the last week of pregnancy) groups. . Body weight, righting reflex, eye opening and locomotion were assessed during different phases of development. Maternal corticosterone levels were determined throughout the experimental period: two days before PNS (baseline) and immediately after the stress sessions on days 14 and 21 of pregnancy. The depressive-like behavior in the forced swimming test and corticosterone levels were measured in the adult male offspring exposed to PNS. Maternal weight gain was impaired by PNS. Corticosterone levels were higher in PNS groups compared to the control group. At birth, PNS males and females weighted less than those on the group CTL. At 21 days of age, PNS males and females fed the regular diet had lower body weight than their respective CTL and coconut fat, but fish oil prevented this effect. PNS increased the latency of righting reflex at day 1 of age, and this impairment was prevented by coconut fat-supplemented diet. However, fish oil impaired the righting reflex in CTL males. PNS induced hyperactivity in 13 day-old male and female pups, and this effect was prevented by fish oil supplementation only in females. In the adulthood, PNS rats showed lower body weight than control. However, the immobility time was lower in PNS than in control rats. After the forced swimming test, plasma corticosterone levels were decreased in PNS fed regular diet compared to control in same diet. No differences were observed with either diet on body weight or immobility behavior. However, the corticosterone levels were modified by early fish oil or coconut fat supplement. The corticosterone response was also lower in control rats whose mothers were fed diets supplemented with fish oil or coconut fat than regular diet. In conclusion, postnatal development from birth to weaning was influenced by PNS and diet and some of the alterations induced by PNS were prevented by coconut fat and fish oil. These data support the idea that PNS causes long-term consequences in

adulthood. Furthermore, both manipulations, PNS and supplemented diets, influenced the corticosterone response in adulthood.