

JANAÍNA DA SILVA ROCHA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 EM RATOS WISTAR
DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO
EMOCIONAL DE MÃES E FILHOTES SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO
MATERNA LONGA**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Deborah Suchecki

Co-orientador: Prof^o Dr José Carlos Fernandes Galduróz

2010

Rocha, Janaína da Silva

Efeitos da suplementação com ÔMEGA-3 em ratos Wistar durante o período de lactação sobre o comportamento emocional de mães e filhotes submetidos à separação materna Longa / Janaína da Silva Rocha – São Paulo, 2010.

xvii, 96p.

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

Titulo em inglês: Effects of omega 3 dietary supplement during lactation on emotional behavior of rat dams and litters submitted to the long maternal separation protocol

1. Separação Materna Longa. 2. Ômega-3. 3. Corticosterona.
4. Labirinto em cruz elevado. 5. Teste do nado forçado.

JANAÍNA DA SILVA ROCHA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 DURANTE O PERÍODO DE
LACTAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO EMOCIONAL DE MÃES E DE
FILHOTES SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO MATERNA LONGA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Boten Lucion

Prof. Dr. Roberto Andreatini

Profa. Dra. Helena Maria Calil

Suplente: Profa. Dra. Paula Ayako Tiba

Aprovada em: 08/04/2010

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

"Sou o que quero ser,
porque possuo apenas uma vida
e nela só tenho uma chance de fazer o que quero.
Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce,
dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana
e esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas,
elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos."

Clarice Lispector

Dedicatória

Aos meus pais, em especial, a minha querida mãe Geni, que acreditou em meus sonhos mesmo quando estes me pareceriam distantes e irreais, pois “o amor de mãe não contempla o impossível” (Paddock). E aos meus irmãos Wagner e Alessandra que são meus cúmplices e companheiros eternos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e Tecnológico, à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo e à Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) que viabilizaram financeiramente este trabalho.

Agradecimentos Especiais

Á Deus por ter me dado saúde, coragem, força, ânimo, perseverança e, acima de tudo, a sabedoria necessária para chegar até aqui, pois, “Tudo posso naquele que me fortalece” (FI 4:13).

A minha Tia Isabel que me acolheu com muito carinho no seu lar, me oferecendo todo o apoio e atenção para que eu não me abatesse com as dificuldades.

Aos meus amigos Aline, Ewerton, Elaine, Márcia e Marina que mesmo distantes não deixaram de estarem presentes em minha vida. E a minha ex-colega de laboratório e grande amiga, Marna, que se solidarizou com a minha insana idéia de vir estudar em São Paulo me encorajando a seguir em frente com os meus objetivos... ”A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem ao descobrir que alguém acredita e confia em você” (Raph Waldo Emerson).

Aos meus colegas do grupo de estudo de Estresse, sempre dispostos a discutir e a compartilhar seus conhecimentos.

A todos os funcionários da Universidade Federal de São Paulo, do Departamento de Psicobiologia, que contribuíram direta ou indiretamente para este estudo.

A Nereide, Mara e a todo o pessoal da secretaria que viabilizou e me ajudou com os processos burocráticos.

Aos bioteristas, em especial ao Kleber Silva Barbosa que realizou a manutenção diária dos animais.

Ao Técnico Marcos Vinícius dos Santos Bunscheit que sempre se mostrou solícito a me auxiliar nos procedimentos experimentais e a lidar com os imprevistos e que se tornou um grande amigo.

A Profa. Dra. Deborah Suchecki pela oportunidade e confiança, sendo sempre muito paciente com as minhas falhas, as quais muitas delas me ajudou a superar, colaborando inestimavelmente para o meu caráter e formação acadêmica... “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 Prof. Dr. José Carlos Fernandes Galduróz com quem aproveitei pequenos, porém preciosos momentos de sabedoria e reflexão... “O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem - mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.” (Albert Einstein)

Mensagem final

"Creio invencivelmente que a ciência e a paz triunfarão sobre a ignorância e a guerra, que os povos chegarão a um acordo, não para destruir, mas para construir, e que o futuro pertencerá aos que mais tiverem trabalhado para aliviar o sofrimento humano." (Pasteur)

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Listas de figuras	xi
Lista de Abreviaturas.....	xvii
Resumo.....	xviii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- OBJETIVO	4
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1- Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em situações de estresse.....	7
2.2-A Importância dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs).....	10
2.3-Consequências dos eventos aversivos no início da vida	15
3-MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1- Animais	20
3.2- Suplementação com n-3.....	21
3.3- Separação Materna Longa.....	23
3.4- Procedimentos com as mães.....	24
3.5- Procedimentos com os filhotes.....	25
3.6- Equipamentos.....	28
3.7- Avaliações comportamentais.....	30
3.8- Avaliação hormonal.....	32
3.9- Análise dos dados.....	33
4- RESULTADOS.....	34

4.1- Avaliação comportamental.....	35
4.2 - Avaliação das concentrações de corticosterona.....	49
5- DISCUSSÃO.....	61
6-CONCLUSÃO.....	69
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

Lista de figuras

Fig.1- Processos de ativação e desativação do eixo HPA.....	10
Fig.2- Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados. Em destaque estão os precursores e seus principais metabólitos.....	12
Fig.3- Linha temporal dos procedimentos de suplementação e separação Materna.....	24
Fig.4- Linha temporal dos procedimentos realizados com as mães.....	25
Fig.5- Procedimentos realizados com os filhotes a partir DPN 31.....	25
Fig.6- Procedimento com os filhotes a partir do DPN 81	27
Fig.7- Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	28
Fig.8- Aparato para Teste do Nado Forçado (TNF).....	29
Fig.9- Aparato para avaliação da atividade locomotora – Campo Aberto.....	30
Fig. 10- Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleos de soja (RS) ou de peixe (RP). # - $p < 0,05$ comparado ao grupo RR. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=7; CTL+RS=7; CTL+RP=8; SM+RR=7; SM+RS=8 e SM+RP=9).....	36
Fig. 11. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleos de soja (RS) ou de peixe (RP). # - $p < 0,05$ comparado ao grupo RR. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=7; CTL+RS=7; CTL+RP=8; SM+RR=7; SM+RS=8 e SM+RP=9).....	37
Fig.12. Tempo de escalamento, imobilidade e nado no TNF (seg), avaliados em mães alimentadas por dieta regular (RR), com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP) e submetidas à separação de seus filhotes por 360 minutos. * - $p < 0,05$	

comparado ao grupo CTL. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM. (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=9; CTL+RS=9; CTL+RP=10; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10)..... 38

Fig. 13. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em fêmeas juvenis amamentadas por mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são média \pm EPM. (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=8; CTL+RS=7; CTL+RP=10; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10)..... 39

Fig. 14. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em fêmeas juvenis, amamentadas por mães alimentadas com dieta regular (RR), ou suplementadas com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=8; CTL+RS=7; CTL+RP=10; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10) 40

Fig. 15. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em machos juvenis amamentados por mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=10; CTL+RS=10; CTL+RP=9; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10)..... 41

Fig.16. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em machos juvenis, amamentadas por mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=10; CTL+RS=10; CTL+RP=9; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10).... 42

Fig. 17. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em fêmeas adultas amamentadas por mães alimentadas com dieta regular (n=14), suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são média \pm EPM de (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12)..... 43

Fig. 18. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em fêmeas adultas, amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são expressos em média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12)..... 44

Fig.19. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em machos adultos amamentados por mães alimentadas com dieta regular (n=14), suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12)..... 45

Fig. 20. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em machos adultos, amamentados por mães alimentadas com dieta regular, suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são expressos em média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12)..... 46

Fig. 21. Tempo de escalamento, imobilidade e nado em segundos no TNF, avaliados em fêmeas adultas amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe e submetidas ao procedimento de separação materna por 360 minutos. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12)..... 47

Fig. 22. Tempo de escalamento, imobilidade e nado em segundos no TNF, avaliados em machos adultos amamentados por mães alimentadas por dieta regular, com óleo de soja ou de peixe e submetidas ao procedimento de separação materna por 360 minutos. Todos os valores são expressos em média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12)..... 48

Fig.23. Concentrações de corticosterona basal, 15 ou 60 minutos após o teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado, em mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † p < 0,05 comparado ao basal; ¥ p < 0,05 comparado a 15 minutos após o LCE. Todos os valores são apresentados como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=7; CTL+RS=7; CTL+RP=8; SM+RR=7; SM+RS=8 e SM+RP=9)..... 50

Fig.24. Concentrações de corticosterona basal e 15 min após o teste comportamental de LCE, em fêmeas juvenis amamentadas por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † p < 0,05 comparado ao basal; # p < 0,05 comparado ao grupo RR; & p < 0,05 comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=18; CTL+RS=16; CTL+RP=16; SM+RR=18; SM+RS=20 e SM+RP=19)..... 52

Fig.25. Porcentagem de liberação de corticosterona em relação aos valores basais em fêmeas juvenis amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidas ao procedimento de separação materna por 360 min. & p < 0,05 comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=18; CTL+RS=16; CTL+RP=16; SM+RR=18; SM+RS=20 e SM+RP=19)..... 53

Fig.26 Concentrações de corticosterona basal e 15 min após o teste comportamental de LCE, em machos juvenis amamentados por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † p < 0,05 comparado ao basal. Todos os valores são expressos como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=20; CTL+RS=18; CTL+RP=18; SM+RR=17; SM+RS=17 e SM+RP=19)..... 54

Fig.27. Porcentagem de liberação de corticosterona em relação aos valores basais em machos juvenis amamentados por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidos ao procedimento de separação materna por 360 min. # p < 0,05 comparado ao grupo RR; & p < 0,05 comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média ± EPM (N

animais/grupo/dieta: CTL+RR=20; CTL+RS=18; CTL+RP=18; SM+RR=17; SM+RS=17 e SM+RP=19)..... 55

Fig.28. Concentrações de corticosterona basal, 15 ou 60 minutos após o teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado, de fêmeas adultas amamentadas por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † p < 0,05 comparado ao basal; ¥ p < 0,05 comparado com 15 minutos após o LCE. Todos os valores são apresentados como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).. 56

Fig.29. Área sob a curva das concentrações de corticosterona de fêmeas adultas amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidos ao procedimento de separação materna por 360 min. # p < 0,05 comparado ao grupo RR; & p < 0,05 comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12)..... 57

Fig.30. Concentrações de corticosterona basal, 15 ou 60 minutos após o teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado, de machos adultos amamentados por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † p < 0,05 comparado ao basal; ¥ p < 0,05 comparado a 15 minutos após o LCE. Todos os valores são apresentados como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=11; CTL+RS=12; CTL+RP=11; SM+RR=12; SM+RS=13 e SM+RP=8).... 59

Fig.31. Área sob a curva das concentrações de corticosterona de machos adultos amamentados por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidos ao procedimento de separação materna por 360 min. & p < 0,05 comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=11; CTL+RS=12; CTL+RP=11; SM+RR=12; SM+RS=13 e SM+RP=8)..... 60

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido araquidônico
ACTH	Hormônio adrenocorticotropico
ALA	Alfa- linolênico
BHT	Butil hidrotolueno
CRH	Hormônio Corticotrópico
COX	Ciclo-oxigenase
CTL	Controle
EPA	Ácido eicosapentoico
D2	Receptor dopaminérgico 2
DGLA	Ácido dihomogandinoléico
DHA	Ácido decosahexanóico
DPN	Dia pós-natal
DPP	Dia pós-parto
GLA	Ácido gamalinoléico
GR	Receptores Glicocorticóides
H	hora
HPA	Hipotálamo- pituitária-adrenal
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina- 6
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
min	minutos
MR	Receptores Mineralocorticóides
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6

ng/ml	nanogramas/mililitros
PLA2	Fosfolipase A2
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGD3	Prostaglandina D3
PGE2	Prostaglandina E2
PUFA	Ácidos Graxos Poliinsaturados
PVN	Núcleo paraventricular
RP	Ração enriquecida com óleo de peixe
RR	Ração Regular
RS	Ração enriquecida com óleo de soja
SM	Separação Materna
SMB	Separação Materna Breve
SML	Separação Materna Longa
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Teste do Nado Forçado
5HT	Serotonina
5HT2	Receptor serotoninérgico 2

Resumo

Muitos estudos têm mostrado que os ácidos graxos poliinsaturados, especialmente ômega-3 ou n-3, são importantes para a boa saúde e desenvolvimento normal. Tais compostos e seus metabólitos ativos são importantes para a manutenção estrutural e fisiológica do Sistema Nervoso Central durante todo o desenvolvimento, principalmente durante as fases iniciais da vida. Sendo assim, avaliamos os efeitos da suplementação com n-3 em mães e ninhadas submetidas ao procedimento de separação materna longa (SML) do dia pós-natal (dpn) 2 ao 14, por um período de 360 min/dia, que constitui um estresse para ambas as partes. Ratas Wistar prenhes com 10 semanas de idade foram distribuídas em 6 grupos: 1) Controle (CTL) + dieta regular; 2) CTL + óleo de soja 3) CTL + óleo de peixe (n-3); 4) Separação materna (SM) + dieta regular; 5) SM + óleo de soja; 6) SM + n-3. A suplementação foi realizada do nascimento até o desmame dos filhotes, que aconteceu no dpn 21. Três dias após o desmame, as mães foram submetidas ao teste de labirinto em cruz elevado (LCE), assim como os filhotes no dpn 31; e ainda três dias após o LCE estas foram avaliadas no teste do nado forçado (TNF). A partir dpn 83, os filhotes, machos e fêmeas, foram desafiados no LCE e TNF. As conseqüências comportamentais da separação foram expressivas em mães, porém com pouca influência na emocionalidade da prole tanto juvenil quanto e adulta. Surpreendentemente o n-3 produziu efeito ansiogênico nas mães, mas não produziu qualquer efeito sobre o comportamento dos filhotes, exceto por uma redução nas concentrações basais de corticosterona da prole feminina adulta e um aumento de reatividade ao estresse em machos e fêmeas adolescentes.

1-INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) são elementos essenciais para a saúde humana e são obtidos exclusivamente pela dieta, pela ingestão de alimentos como grãos e sementes (ex: linhaça, milho e soja) e peixes de águas frias (1). Durante o desenvolvimento, o ômega-3 (n- 3) é fornecido pela mãe ao feto via placentária e no período pós-natal, pelo leite materno (2), sendo que a deficiência nutricional de PUFA nas fases iniciais do desenvolvimento produz alterações neuronais (3,4).

Além dos fatores nutricionais, eventos estressantes como a ruptura da relação mãe-filho podem afetar o desenvolvimento inicial. Em mamíferos, a presença materna é essencial não só porque a mãe fornece calor e nutrição, mas também porque o contato materno é responsável pela regulação de vários mecanismos fisiológicos e psicológicos na prole (5, 6, 7, 8, 9,10).

Entre os vários modelos experimentais de estresse pós-natal, a separação materna longa (SML) é um dos mais amplamente utilizados por mimetizar a negligência no puerpério em humanos (11), além de causar mudanças neurocomportamentais de longo prazo em filhotes (11, 12, 13,14).

Apesar dos vários estudos relacionados à SML, poucos avaliam os impactos deste procedimento no comportamento materno (11, 15) e no da prole juvenil (16, 17, 18, 19). Além disso, há indícios de que eventos aversivos no princípio da vida favorecem o desenvolvimento de ansiedade (20, 21, 22) e depressão (11,23), patologias psiquiátricas nas quais o status adequado de n-3 poderia resultar em melhora do quadro clínico (24, 25). Sendo assim, neste estudo nos propusemos a averiguar os efeitos da separação materna longa no comportamento das proles juvenis e de suas respectivas mães, e, além disso,

apurar se a suplementação com n-3 poderia reduzir ou reverter às possíveis consequências emocionais provocadas por este procedimento.

1.1- OBJETIVO

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar os efeitos da separação entre mães e seus filhotes por 360 minutos nos comportamentos tipo ansioso e tipo depressivo das mães, no comportamento tipo ansioso das proles adolescentes de ambos os gêneros e na resposta de corticosterona das duas populações.

2. Avaliar os efeitos da suplementação com n-3 na dieta das mães sobre esses comportamentos e na resposta de estresse de mães e de seus filhotes na adolescência.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1-Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em situações de estresse.

Considerando as atuais concepções da Biologia, quando nos referimos ao termo adaptação logo pensamos na teoria da Evolutiva de Darwin. Segundo ele, uma característica é preservada em uma espécie, quando essa contribui para a manutenção da espécie no ambiente. Sendo assim o desenvolvimento de um sistema capaz de detectar mudanças ambientais ou inerentes ao próprio indivíduo é fundamental, adequando o organismo às situações de novidade ou ameaça, e que, além disso, seja capaz de adotar estratégias e comportamentos adequados, garantindo dessa forma a sobrevivência (26).

Diante de situações em que o animal é confrontado com a ameaça ao bem-estar, à integridade física ou à própria sobrevivência, este apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas. Tal ameaça pode ser representada por um estímulo natural, como o predador ou por estímulos condicionados que, por associação repetida com a dor ou outras sensações desagradáveis, adquirem propriedades aversivas (27). O ser humano também apresenta reações semelhantes diante de situações de perigo, entretanto, diferente dos outros animais, para nós, as ameaças mais significativas não são as naturais, mas sim os fatores cognitivos que se originam dos conflitos socioculturais (27). As circunstâncias de perigo ou de conflitos cognitivos são encaradas pelo organismo como situações de estresse. O conceito de estresse baseia-se na observação de que diferentes tipos de condições físicas ou psicológicas que ameaçam a homeostase do organismo eliciam o mesmo conjunto de alterações corporais – a chamada “síndrome de adaptação geral” (28).

A resposta ao estresse característica envolve a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e de corticosteróides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) na corrente sanguínea, como resultado da ativação do eixo HPA. Os estímulos ou situações que eliciam a síndrome de adaptação geral são denominados estressores e a resposta do organismo, uma reação ao estresse. Além do eixo HPA, o estresse também ativa a divisão simpática do sistema nervoso neurovegetativo como parte da reação de luta ou fuga, ou “resposta de emergência” (29). Como resultado, a noradrenalina das fibras nervosas simpáticas periféricas é liberada em diferentes tecidos, bem como a adrenalina (também alguma noradrenalina) da medula adrenal, que é liberada na corrente sanguínea. Os estressores podem ser físicos, tais como danos aos tecidos ou mudanças extremas na temperatura, ou psicológicos. Com relação aos últimos, o eixo HPA e o sistema nervoso simpático são ativados pela novidade ou indícios que sinalizem que ocorrerá punição ou ausência de uma recompensa esperada (frustração), gerando, dessa forma, ansiedade antecipatória (30).

Os circuitos cerebrais envolvidos nas respostas neuroendócrinas aos estressores psicológicos incluem a ativação cortical do núcleo basolateral da amígdala que, por sua vez, ativa o seu núcleo central. A mensagem é então transmitida aos neurônios hipotalâmicos por meio de diferentes caminhos: um direto; um indireto, por meio do núcleo da estria terminal; e outro ainda, por meio da serotonina (5-HT) do tronco cerebral e dos neurônios que contêm catecolaminas (31).

Os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotropina (CRH) na circulação porta-hipofisária para a glândula pituitária. Na pituitária anterior, o CRH estimula as células secretoras de

hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que atuando no córtex adrenal promove a liberação de corticosteróides na corrente sanguínea. Os glicocorticóides, cortisol – em humanos e primatas – e corticosterona – em roedores – produzem diversas alterações em inúmeras funções do organismo, quando se ligam aos seus receptores mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR) (32). As afinidades destes dois receptores pelos glicocorticóides são diferentes, sendo que os MR possuem uma alta afinidade e prolongada ativação, enquanto que os GRs, com baixa afinidade, respondem de forma fásica às elevações de glicocorticóides. Esses receptores são ativados com o aumento da liberação de corticosteróide induzido pelo estresse ou pela oscilação circadiana (32).

A resposta ao estresse deve ocorrer prontamente, quando necessário, e seu desligamento deve acontecer assim que a situação de perigo se cessa. Essa inibição do eixo HPA é promovida pelos próprios corticosteróides que atuam principalmente sobre os receptores GRs do hipotálamo e da hipófise inibindo a liberação de CRH e ACTH, respectivamente (32). (Fig.1)

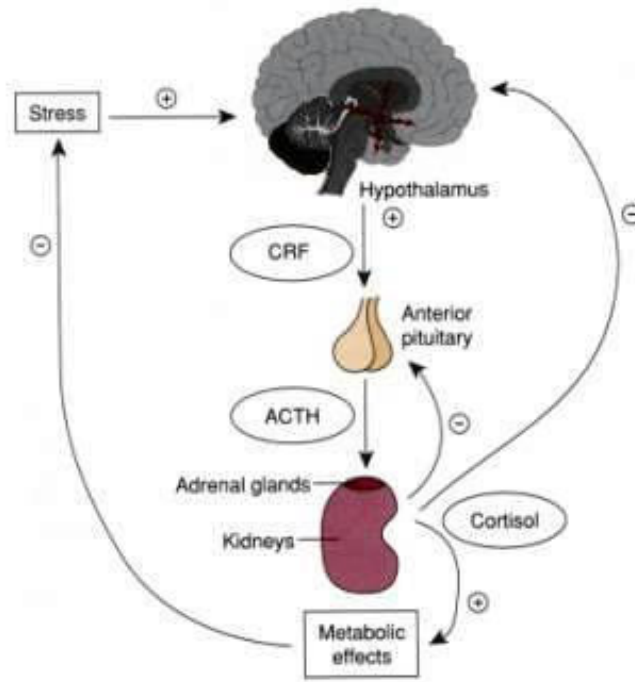


Figura 1- Processos de ativação e desativação do eixo HPA.

Devido ao envolvimento do eixo HPA com importantes processos fisiológicos e redes neuronais, a alteração de atividade deste sistema pode afetar funções reprodutivas e imunológicas, aumentando a vulnerabilidade ao desenvolvimento de doenças (32,33, 34, 35), inclusive de distúrbios psiquiátricos como a ansiedade e a depressão (31,36).

2.2-A Importância dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs)

Entre os vários elementos essenciais comuns na dieta, destacam-se os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Estes recebem tal denominação por não serem sintetizados pelo organismo, embora apresentem extremo valor para a otimização do estado fisiológico (37-39). Há uma variedade de tipos de ácidos graxos poliinsaturados essenciais, porém os mais bem estudados são os ácidos linoléico (LA) ou ômega 6 (n-6) e alfa-linolênico (ALA) ou ômega-3 (n-3). Ambos

são adquiridos a partir da alimentação e metabolizados distintamente, sendo que os metabólitos mais conhecidos do n-6 são os ácidos gamalinolênico (GLA), dihomogamalinolênico (DGLA) e araquidônico (AA) e do n-3, os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (40) (Fig. 2). Essas duas classes de PUFAs são metabólica e funcionalmente distintas e possuem funções opostas, como por exemplo, supressão da síntese de citocinas interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) pelo n-3, enquanto que o n-6 estimula a produção dessas citocinas (41, 42). Muitas das ações fisiológicas dos PUFAs devem-se ao fato de que estes fazem parte da composição das membranas celulares e medeiam vários mecanismos intrínsecos à célula, podendo influenciar a atividade da proteína cinase C, modular a resposta imunológica, participar da síntese de eicosanóides (ex. prostaglandinas) e de sinais de transdução, mediar a ação de fatores de crescimento, influenciar a síntese de radicais livres e óxido nítrico, modificar a fluidez da membrana neuronal, modificar enzimas ligadas à atividade da membrana e o seu funcionamento, alterar canais iônicos, o número e afinidade de receptores e ativar fatores nucleares de transcrição (37, 42, 43, 44).

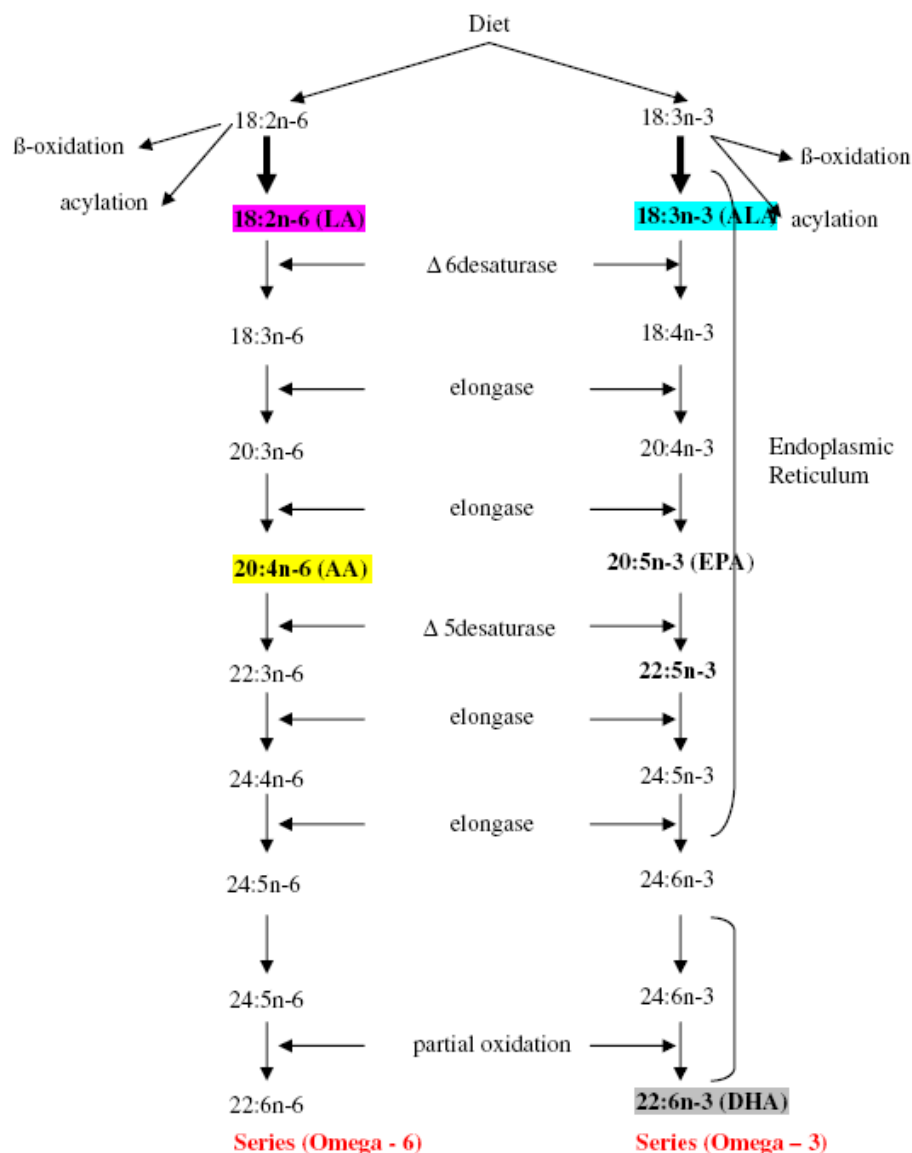


Fig.2- Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados. Em destaque estão os precursores e seus principais metabólitos (Borsonelo e Galduróz, 2008 [40])

Algumas evidências mostram a importância dos ácidos graxos essenciais e seus metabólitos ativos na manutenção estrutural e fisiológica do Sistema Nervoso Central (SNC) (39), sendo que a deficiência nutricional (3, 4), assim como o excesso (45, 46, 47) de PUFA durante o desenvolvimento fetal e neonatal podem acarretar em alterações neuronais.

Durante a gravidez o feto depende totalmente do estoque materno de PUFA, principalmente do DHA, sendo que o 3º trimestre da gestação é nutricionalmente crítico, pois é neste período que a demanda deste elemento aumenta para a formação do sistema nervoso fetal (39,48). Os estoques de DHA são depletados com a progressão da gestação e são lentamente repostos (5 ou 6 meses após o nascimento), sendo que essa redução de DHA materna parece estar correlacionada à depressão pós-parto (39,49). No período pós-natal quando o sistema nervoso encontra-se em pleno desenvolvimento, o leite materno parece ser a principal fonte de DHA e AA para a criança, sendo que as concentrações desses ácidos graxos variam de acordo com a dieta materna. Estudos mostram que crianças amamentadas por mães que receberam suplementação nutricional com n-3 durante a lactação apresentaram melhor desenvolvimento psicomotor, coordenação visual e acuidade auditiva (50, 51).

Os PUFAs são importantes não somente nas primeiras fases do desenvolvimento, como também durante a vida inteira de um ser humano. Estudos clínicos sugerem que estes ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o n-3, têm a capacidade de prevenir várias doenças, inclusive patologias psiquiátricas (24,25). Muitas pesquisas investigam a associação entre o n-3 e distúrbios emocionais como a ansiedade e depressão, sendo que os estudos epidemiológicos apresentam evidências de uma menor prevalência de sintomas depressivos em populações que consomem dietas ricas em n-3 (24, 52, 53, 54, 55, 56). Ao avaliar as concentrações séricas de PUFA em ésteres de colesterol e fosfolípídeos de pacientes com depressão, observa-se uma redução nas concentrações de n-3 total(57,58). Esta mesma redução, também é observada na membrana de hemácias de pacientes depressivos (59,60), assim como em

indivíduos que apresentam fobia social (61). Pacientes com ansiedade ou depressão tratados com suplementos de n-3 apresentam melhora significativa dos sintomas depressivos ou ansiosos comparados a pacientes que recebem placebo (25, 62, 63, 63, 65). Assim como em humanos, animais suplementados com dietas enriquecidas com n-3 mostram uma diminuição no perfil ansioso (66) e depressivo (67-70).

Além disso, os PUFAs e dietas gordurosas parecem interferir nas concentrações de corticosterona (66, 71, 72, 73). Em filhotes alimentados com dieta rica em gordura após o desmame, observam-se concentrações basais de corticosterona elevadas (72). Este aumento parece persistir ao longo do tempo, pois, filhotes com 35 dias de vida que foram amamentados por mães que receberam uma dieta rica em lipídios mantiveram altas concentrações de corticosterona até 120 minutos após exposição ao éter (71). Em animais suplementados com dieta enriquecida com n-3, nota-se que as concentrações de corticosterona são maiores, comparadas às de animais que recebem dieta regular (73). Entretanto, alguns estudos mostram que o n-3 é capaz de atenuar o aumento de corticosterona após administração intraventricular de IL-1 (42, 66) ou depois de serem submetidos ao teste de nado forçado (TNF) (74). Sendo assim, parece que os PUFAs influenciam a liberação de corticosterona, entretanto, o mecanismo de ação destes ácidos graxos sobre o eixo HPA não está claro.

2.3-Consequências dos eventos aversivos no início da vida

Além dos fatores nutricionais, outras variáveis, como eventos estressantes durante os períodos pré e/ou pós-natal, podem afetar significativamente o desenvolvimento cerebral, mental, cognitivo e psicoemocional, refletindo-se em fases mais tardias da vida. Por exemplo, crianças que sofreram abuso ou foram negligenciadas são mais suscetíveis ao aparecimento de patologias psiquiátricas e desordens afetivas na idade adulta (75,76,77,78). A fase inicial da infância é considerada um período crucial, pois nos primeiros anos de vida o desenvolvimento cerebral é completado. Portanto o cuidado, o estado de saúde e o comportamento maternal são angulares neste momento.

Para muitos mamíferos a presença materna não somente é fundamental como fonte primária de calor, nutrição e contato físico, que são necessários para a sobrevivência dos filhotes, mas também como regulador de inúmeros processos fisiológicos, comportamentais e psicológicos (5-10). É evidente, portanto, que o estado emocional da mãe pode influenciar o desenvolvimento infantil. A depressão materna, por exemplo, pode afetar múltiplos domínios da criança, acarretando vários problemas, desde dificuldades sócio-emocionais (redução da expressão positiva de afeto, instabilidade emocional, e debilitação social) e comportamentais (79), aumento da negatividade e medo (80), insegurança (81) e déficit cognitivo (82-84). As consequências fisiológicas em filhos de mães depressivas incluem baixo peso nos primeiros dois anos de vida (85,86), concentrações elevadas de cortisol e noradrenalina e baixas concentrações de dopamina (87,88).

Em humanos, a maior parte dos distúrbios emocionais está ligada a perdas, separações ou mudanças sociais significativas. Entre os vários modelos

experimentais de estresse pós-natal, a separação materna é um dos mais amplamente utilizados por mimetizar a negligência no puerpério em humanos (11). Então, a partir deste princípio, a separação materna se encaixa neste perfil, fornecendo importantes informações a respeito dos efeitos dessa manipulação sobre a resposta comportamental, padrões de hierarquia social, mudanças de curto e longo prazos na função imunológica (13), distúrbios de sono (12,14), distúrbios hormonais e distúrbios neuroquímicos (11). Muitos dos estudos sobre estresse precoce demonstram o impacto desse procedimento sobre a atividade do eixo HPA resultando em alterações permanentes na resposta hormonal ao estresse (13,20,21,89,90,91), podendo atuar como fator de risco para o desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo (11,23) e de comportamento tipo-ansioso (20,21,22) em fases tardias da vida.

As conseqüências tardias do rompimento da relação mãe-filhote por 15 minutos ou 3 horas (separação materna breve [SMB] e separação materna longa [SML], respectivamente) estão bem caracterizadas na linhagem Sprague-Dawley. A SMB freqüentemente resulta em animais que apresentam uma resposta mais adequada ao estresse, com menor comportamento de medo e ansiedade, e maior eficiência do sistema de retroalimentação negativa da corticosterona (91-94). Por outro lado, filhotes submetidos à SML geralmente tornam-se hiper-responsivos ao estresse, exibindo elevada expressão de RNAm do CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), altas concentrações de ACTH e de corticosterona (CORT) em resposta ao estresse e mais comportamento ansioso na idade adulta (92,95,96).

Os efeitos da SMB e SML sobre o comportamento materno resultam em padrões opostos. Mães separadas de seus filhotes diariamente por breves

períodos apresentam aumento do comportamento maternal, enquanto que mães separadas por longos períodos mostram redução do mesmo (97,98). Tais comportamentos maternos distintos parecem refletir de forma discriminada nos filhotes (5).

Dados indicam que a remoção dos filhotes das gaiolas-moradia representa um evento estressante para as mães, causando um aumento significativo das concentrações plasmáticas de CORT (89). Entretanto, embora ocorra habituação da resposta de CORT com a repetição deste procedimento, o comportamento das mães é afetado significativamente. Apesar de se conhecer pouco sobre o impacto da separação repetida sobre a emocionalidade materna, alguns estudos analisam os efeitos destas manipulações especialmente após o desmame. Boccia e colaboradores (11) constataram que mães Long-Evans submetidas à separação de seus filhotes por um período de duas semanas apresentam comportamento tipo-depressivo imediatamente após o desmame, porém essas consequências se manifestam muito além do desmame modificando o comportamento motivacional e de reatividade das mães a novos ambientes (15). Esses estudos sugerem que a SML pode induzir mudanças prolongadas em mães.

Em relação aos efeitos da separação materna na fase juvenil das proles, existem poucos estudos. A fase juvenil, também conhecida como adolescência, é o período de transição da infância para a vida adulta que envolve maturação do comportamento social e cognitivo (99). É na adolescência que comportamentos sociais tipicamente masculinos (100) e de risco (101) emergem. Há marcantes diferenças no comportamento de adolescentes e adultos, sendo que os primeiros apresentam maiores níveis de impulsividade e menor estresse e ansiedade em resposta a novidades (102). Não há uma clara distinção para o começo e fim da

adolescência para humanos e nem para animais, porém, para fins práticos se padronizou a adolescência em três fases para roedores, sendo que a pré-adolescência compreende o período de 21 a 34 dias, a meia-adolescência de 34 a 46 dias de idade e a adolescência tardia de 46 a 59 dias (103). Além das mudanças comportamentais, intensas modificações neurológicas ocorrem durante este período, como por exemplo, a poda das sinapses e reorganização de muitos sistemas de neurotransmissores (104), mudanças significativas nas concentrações e densidade dos receptores dos neurotransmissores (105-107), desenvolvimento das sinapses e ampla mielinização do córtex cerebral (108, 109). Estudos mostram que estressores pós-natais alteram o desenvolvimento cerebral, resultando em modificações no comportamento e na fisiologia de animais adultos (92,110). O mesmo se observa em animais adolescentes, como evidenciam estudos recentes (16-19).

3-MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais descritos nesta dissertação foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (CEP 2037/07), estando em acordo com a CIOMS (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, Genebra, 1985).

3.1- Animais

Foram utilizadas ratas Wistar prenhes, com 10 semanas de idade, obtidas do biotério do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (38,4 x 31,5 x 17 cm) 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).

O dia do nascimento foi designado dia pós- natal (dpn) e dia pós-parto (dpp) 0. Neste dia iniciou-se a suplementação das mães com uma das três diferentes dietas: dieta regular (RR), dieta enriquecida com óleo de soja (RS) ou com óleo de peixe (RP). No dpn 1, as ninhadas foram padronizadas para 8 filhotes, 4 machos e 4 fêmeas (ou o mais próximo desta proporção). Foram obtidas 60 ninhadas e as mães/ninhadas foram distribuídas nos seguintes grupos: 1) Controle (CTL) + ração regular (CTL+RR); 2) CTL + ração com óleo de soja (CTL+RS); 3) CTL + ração com óleo de peixe (n-3) (CTL+RP); 4) Separação materna (SM) + ração regular (SM+RR); 5) SM + ração com óleo de soja (SM+RS); 6) SM + ração com n-3 (SM+RP).

3.2- Suplementação com n-3

Os grupos suplementados com n-3 foram alimentados com uma dieta enriquecida com 20% de óleo de peixe preparada a partir da ração comercial (Nuvilab®) (0,215 ml de óleo de peixe por grama de ração). As proporções de proteína e de antioxidante foram ajustadas (butil hidrotolueno [BHT]) para equilibrar o conteúdo de proteína e controle da peroxidação lipídica, respectivamente. Como a dieta com n-3 possui um valor energético diferente da dieta comercial, incluímos um grupo que foi suplementado com uma dieta caloricamente equiparável, enriquecida com óleo de soja. A escolha do óleo de soja foi devida ao fato de que este é o óleo mais comumente utilizado por humanos na preparação de alimentos. As rações enriquecidas com n-3, assim como com óleo de soja, foram oferecidas às mães a partir do nascimento das ninhadas até o desmame. Os grupos não-suplementados foram alimentados apenas com ração comercial (Nuvilab®). A concentração de óleo de peixe foi escolhida com base em estudos realizados com mulheres gestantes e lactantes (2, 111) e com animais, em estudos realizados previamente (74). As tabelas com a composição dos ácidos graxos que compõem a ração comum e a suplementada com óleo de peixe (Tab. 1), assim como dos ácidos graxos que compõem o óleo de peixe e de soja (Tab. 2) estão apresentadas a seguir.

Tab.1- Composição dos ácidos graxos da dieta regular e suplementada com óleo de peixe

Ácidos Graxos	Dieta Regular	Dieta suplementada com óleo de peixe
Saturados		
C6:0 capríco	0,00	0,00
C8:0 caprílico	0,00	0,00
C10:0 cáprico	0,00	0,00
C12:0 láurico	0,00	<50
C14:0 mirístico	0,00	880
C15:0 pentadecaenóico	0,00	70
C16:0 palmítico	698	2021
C17:0 margárico	0,00	57
C18:0 esteárico	140	349
C20:0 araquídico	<50	<50
C22:0 behênico	<50	<50
Monoinsaturado		
C14:1 miristoleico	0,00	<50
C16:1 palmitoleico	0,00	992
C17:1 heptadecenoico	0,00	<50
C18:1 cis-octadecenoico n-9	1113	1395
C20:1 eicosaenoico	<50	83
Poliinsaturado		
C18:2 linoleico	2510	1811
C18:3 linolênico	212	251
C20:5 eicosapentaenoico n-3	0,00	1007
C22:6 docohexaenoico n-3	0,00	844
Total de lipídeos*	6,81	17,29

Valores estão expressos em mg/100g, *expressos em g/100g (Borsonelo e Galduróz, 2010 [74])

Tab. 2- Composição dos ácidos graxos dos óleos de peixe e de soja

Ácidos Graxos	Óleo de soja	Óleo de peixe*
Saturados		
C14:0 Mirístico ^a	-	6-9
C16:0 Ácido Palmítico ^b	12,7	15-20
C18:0 Ácido Esteárico ^b	3,9	3-4
Monoinsaturados		
C16:1 Palmitoléico ^a	-	9-14
C18:1 Ácido Oléico n-9 ^b	23,6	5-12
Poliinsaturados		
C18:2 Ácido Linoléico n-6 ^b	55,3	<3
C18:3 Ácido Linolênico n-3 ^b	4,5	<3
C20:5 eicosapentaenóico n-3 ^c	0,2	15

Valores expressos em porcentagem (a - Malacrida e Jorge, 2003 [112], b - Nepomucemo *et al.* 2009 [113], c - Vieira *et al.* 2005 [114],* Sigma-Aldrich [115].)

3.3- Separação Materna Longa

A partir do dpn 2 até o dpn 14, as ninhadas foram separadas das mães por 360 min/dia, com início às 7:30 h (Fig.3). Para o procedimento, os filhotes foram retirados das gaiolas-moradia e colocados em gaiolas com serragem nova, sobre uma manta térmica para manter a temperatura do ninho. As mães permaneceram nas gaiolas-moradia durante o tempo de separação. Ao devolver as ninhadas às mães, os filhotes foram espalhados aleatoriamente pela gaiola-moradia. No grupo SM, metade da serragem das gaiolas-moradia foi trocada 1 vez por semana. Para o grupo CTL, a serragem foi trocada a cada 2 dias (mesmo esquema do biotério)

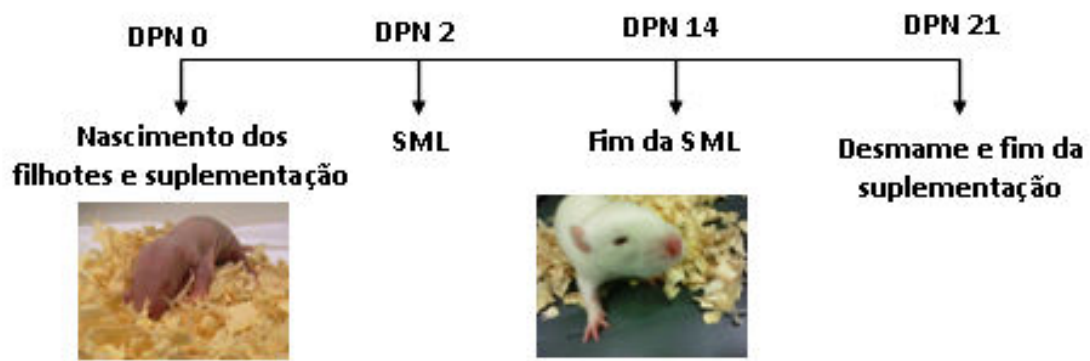


Fig.3- Linha temporal dos procedimentos de suplementação e separação materna

3.4- Procedimentos com as mães

No dpp 19, durante a separação, as mães foram habituadas ao procedimento de coleta de sangue por incisão na ponta da cauda. No dpp 21, imediatamente após o desmame das ninhadas, pela manhã, foi coletada uma amostra de sangue para posterior dosagem de corticosterona (medida BASAL). No dpp 24, as mães de cada grupo foram submetidas ao labirinto em cruz elevado (LCE, sessão de 5 min). Aos 15 e 60 min após a realização do teste (T=15 e T =60) foram coletadas novas amostras de sangue pela cauda. No dpp 27, as mães foram submetidas ao pré-teste no TNF (habituação/treinamento), e no dia seguinte, foram de fato avaliadas no TNF. Foi dado um intervalo de 48 h entre as coletas de sangue para a medida basal e os testes comportamentais, com o intuito de amenizar o estresse causado pelos procedimentos (Fig.4).

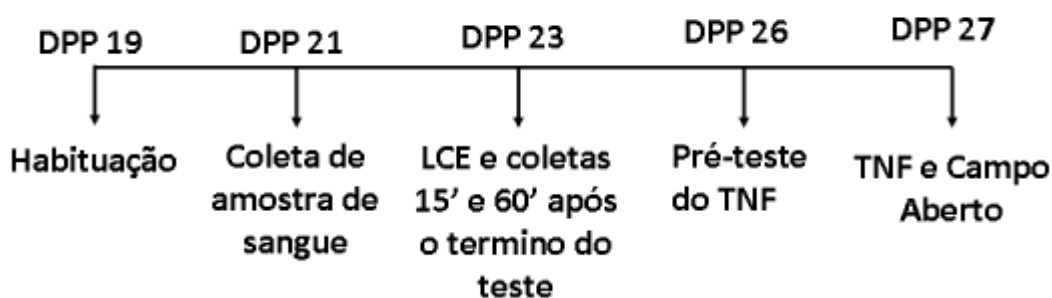


Fig.4 - Linha temporal dos procedimentos realizados com as mães

3.5 - Procedimentos com a prole

Para descartar a possibilidade que uma característica tenha sido específica para uma determinada ninhada, no dpn 31, 1 macho e 1 fêmea de cada ninhada foram eutanasiados imediatamente antes do início do experimento para obtenção de amostra para a determinação da concentração basal de corticosterona. No mesmo dia, 1 macho e 1 fêmea das mesmas ninhadas foram expostos ao LCE (Tab. 3) e eutanasiados 15 min após o término da sessão (T=15 min) (Fig.5).

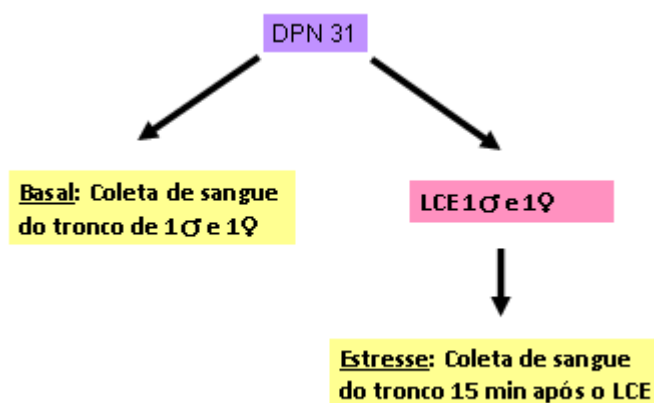


Fig.5 - Procedimentos realizados com os filhotes a partir DPN 31.

Para avaliar a reatividade do eixo HPA, realizou-se o teste de reatividade ao estresse (116); na qual se compara a porcentagem de liberação de corticosterona dos animais submetidos ao LCE com aqueles que não passaram por este teste (Basal).

Tab. 3- Número de animais juvenis em cada grupo/dieta nos quais foram coletadas amostras basais ou 15 minutos após o LCE.

Grupos	Fêmeas	Fêmeas	Machos	Machos
	Juvenis	Juvenis	Juvenis	Juvenis
	Basal	T=15min	Basal	T= 15
CTL+RR	10	8	10	10
CTL+RS	9	7	8	10
CTL+RP	6	10	9	9
SM+RR	8	10	7	10
SM+RS	10	10	7	10
SM+RP	9	10	9	10

Os machos e fêmeas restantes de cada grupo foram mantidos até a idade adulta para realização dos testes a partir do dpn 81, quando foram submetidos à coleta de sangue pela cauda (concentração BASAL de corticosterona) e no dpn 83, esses animais foram expostos ao LCE ou TNF, e coletas de sangue foram realizadas aos 15 e 60 min após o término do teste do LCE (Tab.4). Uma semana depois, os animais que foram submetidos ao TNF foram expostos ao LCE e vice-versa (Fig.6).

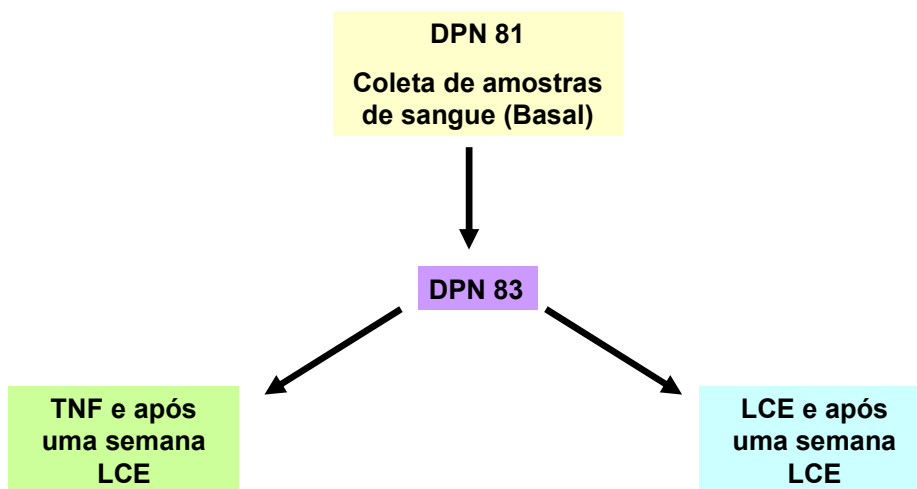


Fig. 6- Procedimento com os filhotes a partir do DPN 81

Tab. 4- Número de animais adultos em cada grupo/dieta que foram avaliados no TNF e/ou LCE, e nos quais foram coletadas amostras basais ou 15 e 60 minutos após o LCE.

Grupos	Fêmeas Adultas	Machos Adultos
CTL+RR	12	11
CTL+RS	12	11
CTL+RP	12	12
SM+RR	12	12
SM+RS	11	13
SM+RP	12	8

3.6- Equipamentos

3.6.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Aparato construído de madeira, com quatro braços, em forma de cruz, medindo 50 cm de comprimento por 10 cm de largura. Possui um quadrado central de 12 x 12 cm. Dois desses braços são abertos (BA) e os outros dois são fechados (BF) por paredes com 30 cm de altura, sendo que o labirinto fica elevado a 50 cm do piso (Fig.7).



Fig.7- Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

3.6.2 Aparato para o Teste da Natação Forçada (TNF)

Cilindro vertical de acrílico (50 cm de altura e 30 cm de diâmetro), contendo 30 cm de água na temperatura de 21-24°C, adaptado do modelo descrito por Porsolt *et al.* (117) (Fig.8).



Fig. 8- Aparato para Teste do Nado Forçado (TNF)

3.6.3 Campo Aberto

Aparato construído em madeira (60 x 60 cm), com paredes de 30 cm de altura e com nove quadrados demarcados no piso (20 x 20 cm) (Fig.9).

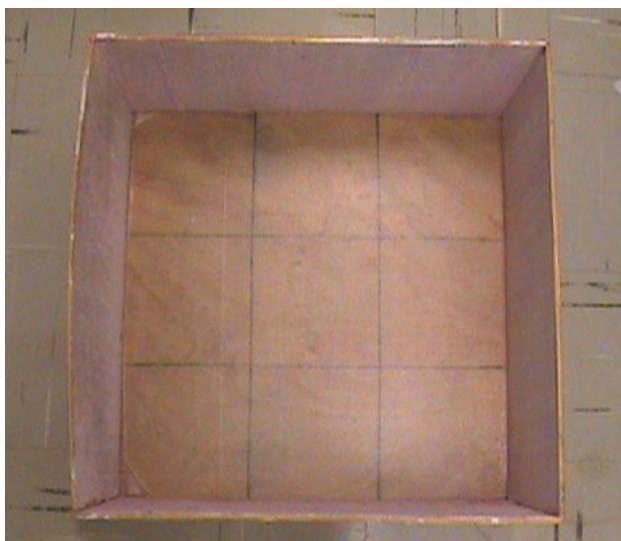


Fig. 9- Aparato para avaliação da atividade locomotora – Campo Aberto

3.7- Avaliações comportamentais

3.7.1- Labirinto em Cruz Elevado

Os animais foram avaliados individualmente por cinco minutos no aparato, sendo colocados no quadrado central com a face voltada para o braço aberto. A saída para um dos braços do labirinto foi considerada apenas quando o animal cruzava o quadrante com as quatro patas. Os testes foram realizados sob iluminação e temperatura controladas, sendo conduzidos entre as 9:00 h e 14:00 h e registrados por sistema de vídeo. Entre um animal e outro, o aparelho foi limpo com álcool a 20%. Para se avaliar o perfil de ansiedade dos animais analisou-se a frequência e o tempo de permanência nos BFs e BAs, sendo que quanto maior o número de entradas e de tempo de permanência nos BFs, mais

ansioso era considerado o animal; e quanto maior a frequência e tempo de permanência nos BAs, menos ansioso era considerado o animal.

3.7.1- *Teste de Nado Forçado*

O teste procedeu-se de acordo com o modelo descrito por Porsolt *et al.* (117). Os animais foram submetidos a uma sessão de pré-teste, na qual eram colocados individualmente dentro da água, e permaneciam por um período de 15 min. Ao final deste período, eram secados com uma toalha e recolocados em suas caixas. Após 24 h, os ratos foram submetidos à segunda sessão (sessão teste) por um período de 5 min, onde o comportamento foi filmado. As avaliações foram realizadas entre 9:00 h e 13:00 h.

Para a avaliação do TNF a latência e o tempo total de três parâmetros foram registrados: escalamento, nado e imobilidade.

Considerava-se escalamento os movimentos de escape, com batimento vigoroso de patas traseiras na água e de patas dianteiras contra a parede do tanque, muito acima da lâmina de água. O nado foi caracterizado pelo movimento constante das patas traseiras e dianteiras acima da lâmina d'água, porém de forma menos exaltada. A imobilidade foi caracterizada por movimentos suficientes para manter o animal com o focinho acima da lâmina d'água. Os comportamentos no TNF, assim como os no LCE foram analisados por intermédio do programa Etholog 2.2 (118).

3.7.3- *Campo Aberto*

Imediatamente após a avaliação no TNF os animais foram expostos por 5 min ao campo aberto, mantendo-se as mesmas condições experimentais, com o

objetivo de verificar se a atividade locomotora dos animais testados poderia ter influenciado o resultado dos testes comportamentais. Para a medida de atividade locomotora utilizamos o número de quadrados percorridos durante esse tempo, com a passagem completa das quatro patas de uma para outra das 9 secções do assoalho.

3.8- Avaliação hormonal

3.8.1- Ensaio para determinação de corticosterona plasmática

As concentrações de corticosterona mensuradas a partir de amostras de sangue coletadas dos animais foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio, com anticorpo específico para ratos e camundongos, com o kit comercial fabricado pela ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA), com protocolo modificado, que utiliza metade do volume dos reagentes (119). 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.

3.8.2- Cálculo da reatividade ao estresse

Para verificar a reatividade dos animais juvenis ao estresse, utilizou-se a fórmula $[100 - (\text{BASAL} \times 100 / \text{Pós-LCE})]$ para calcular a porcentagem da diferença das concentrações de corticosterona dos animais que foram submetidos ao LCE (Pós-LCE) em relação aos animais do mesmo grupo que não passaram por qualquer avaliação comportamental. Para tanto, consideramos o valor basal de um animal da ninhada e o pós-LCE do irmão (ou irmã), testados no mesmo dia, visto que a variação individual intra-ninhada é pequena.

3.9 - Análise dos dados

As análises individuais das variáveis contínuas coletadas nos testes de LCE (número de idas às extremidades dos braços abertos, número de entradas nos braços fechados e abertos e porcentagem de tempo de exploração nos braços fechados e abertos) e de nado forçado (tempo de nado, tempo de escape e tempo de imobilidade) e as concentrações plasmáticas de corticosterona dos filhotes e das mães foram realizadas pelo GLM (General Linear Model) em função das variáveis categóricas “Grupo” (CTL, SM) x “Ração” (RR, RS e RP) e da medida repetida (Tempo). A análise *a posteriori* foi realizada pelo teste de Newman-Keuls. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1- Avaliação comportamental

4.1.1 - Mães

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Ao analisar os parâmetros avaliados em mães no LCE, não se observou efeitos da manipulação pós-natal ou da interação da manipulação com a ração para nenhum deles. Entretanto, houve efeito da ração para número de idas às extremidades dos braços abertos ($F(2,39) = 3,30, p=0,05$), número de entradas nos braços abertos ($F(2,39) = 4,45, p=0,02$), porcentagem de tempo de exploração dos braços fechados ($F(2,39) = 4,90, p=0,01$) e porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ($F(2,39) = 4,90, p=0,01$). As mães que foram alimentadas com ração de peixe (RP) visitaram menos as extremidades dos braços abertos ($p<0,05$), e entraram menos vezes nos braços abertos ($p<0,01$) (Fig.10). Também despenderam menos tempo nos braços abertos, ($p<0,01$) e mais tempo nos braços fechados ($p<0,01$) em comparação às mães que receberam ração regular (RR) (Fig.11).

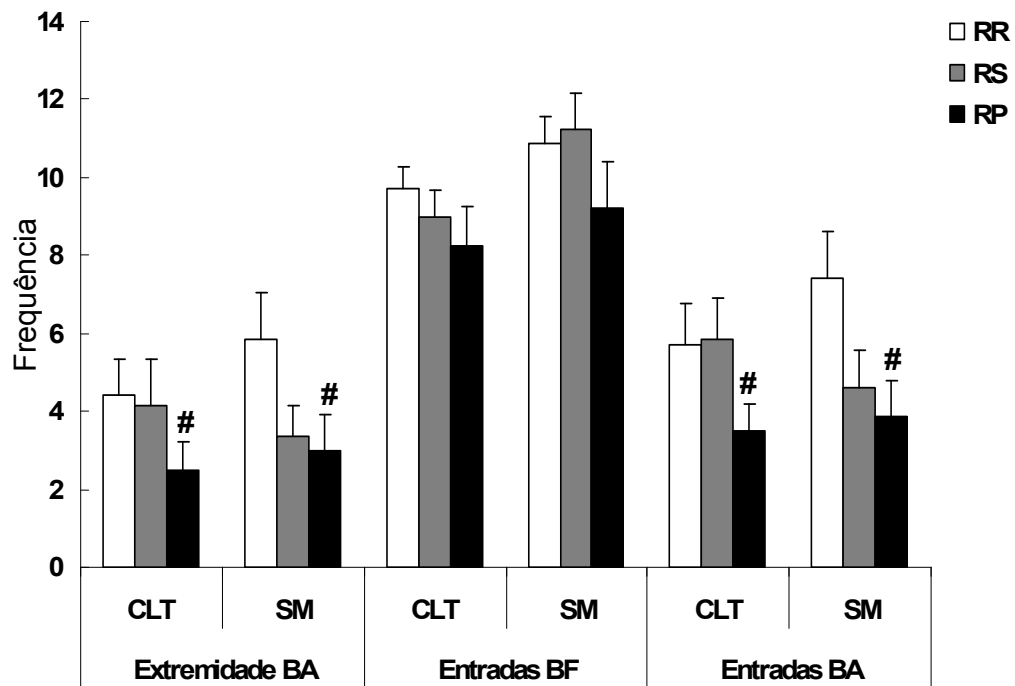


Fig. 10. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleos de soja (RS) ou de peixe (RP). # - $p < 0,05$ comparado ao grupo RR. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=7; CTL+RS=7; CTL+RP=8; SM+RR=7; SM+RS=8 e SM+RP=9)

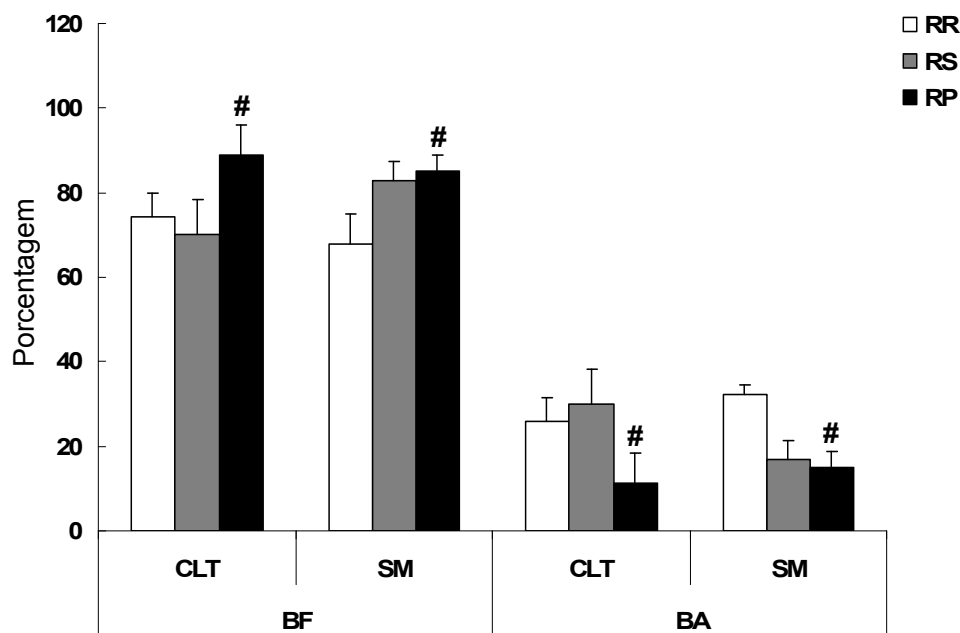


Fig. 11. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleos de soja (RS) ou de peixe (RP). # - $p < 0,05$ comparado ao grupo RR. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=7; CTL+RS=7; CTL+RP=8; SM+RR=7; SM+RS=8 e SM+RP=9)

Teste do Nado Forçado (TNF)

Quanto aos parâmetros avaliados no TNF não foram observadas quaisquer diferenças no tempo de escalamento e de imobilidade. Porém, houve um efeito da manipulação pós-natal no tempo de nado ($F(1,52) = 7,94, p < 0,01$), sendo que o grupo de mães SML apresentou maior duração deste comportamento em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$) (Fig.12). Nenhuma diferença na atividade motora medida no campo-aberto foi observada em relação ao tipo de manipulação ($F(1,54) = 0,01, p = 0,91$), razão ($F(2,54) = 0,10, p = 0,91$) ou à interação entre os fatores ($F(2,54) = 3,08, p = 0,06$).

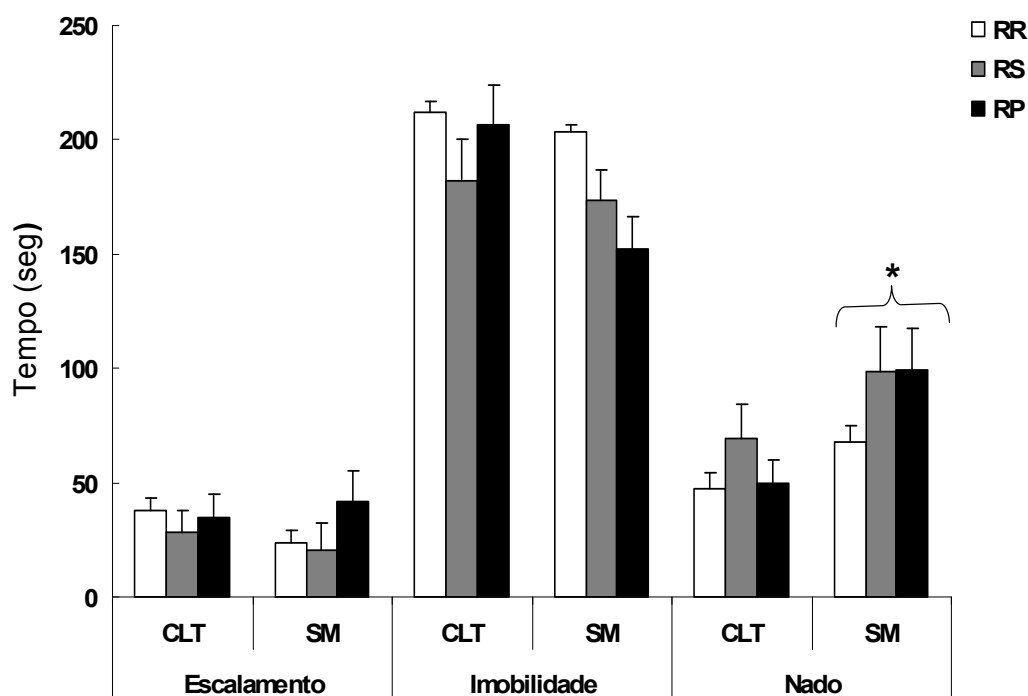


Fig.12. Tempo de escalamento, imobilidade e nado no TNF (seg), avaliados em mães alimentadas por dieta regular (RR), com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP) e submetidas à separação de seus filhotes por 360 minutos. * - $p < 0,05$ comparado ao grupo CTL. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM. (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=9; CTL+RS=9; CTL+RP=10; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10).

4.1.2 – Filhotes Juvenis

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Tanto em fêmeas (Fig. 13 e 14) quanto em machos adolescentes (Fig. 15 e 16) testados aos 31 dias de vida, não foi observado qualquer efeito da manipulação (respectivamente $F(4,84) = 0,35$, $p=0,83$; $F(4,89) = 1,75$, $p=0,15$), da dieta ($F(8,168) = 0,47$, $p=0,17$; $F(8,178) = 1,05$, $p=0,40$) ou da interação entre ambos (para fêmeas $F(8,168) = 1,10$, $p=0,37$) nos parâmetros avaliados no LCE

(números de idas até as extremidades dos braços abertos, número e tempo de exploração nos braços fechados, porcentagem de número de entradas nos braços abertos, porcentagem de tempo de exploração nos braços abertos). Apesar de a análise multivariada ter indicado interação entre manipulação e ração em machos juvenis ($F(8,168) = 2,21, p=0,03$), não se observou qualquer diferença na análise *a posteriori*.

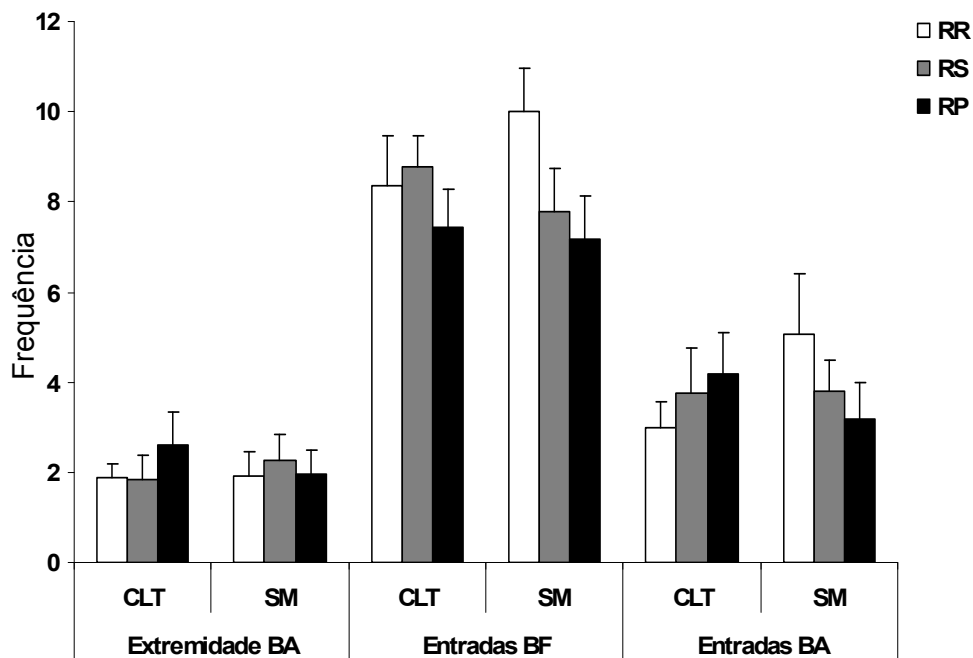


Fig. 13. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em fêmeas juvenis amamentadas por mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são média \pm EPM. (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=8; CTL+RS=7; CTL+RP=10; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10)

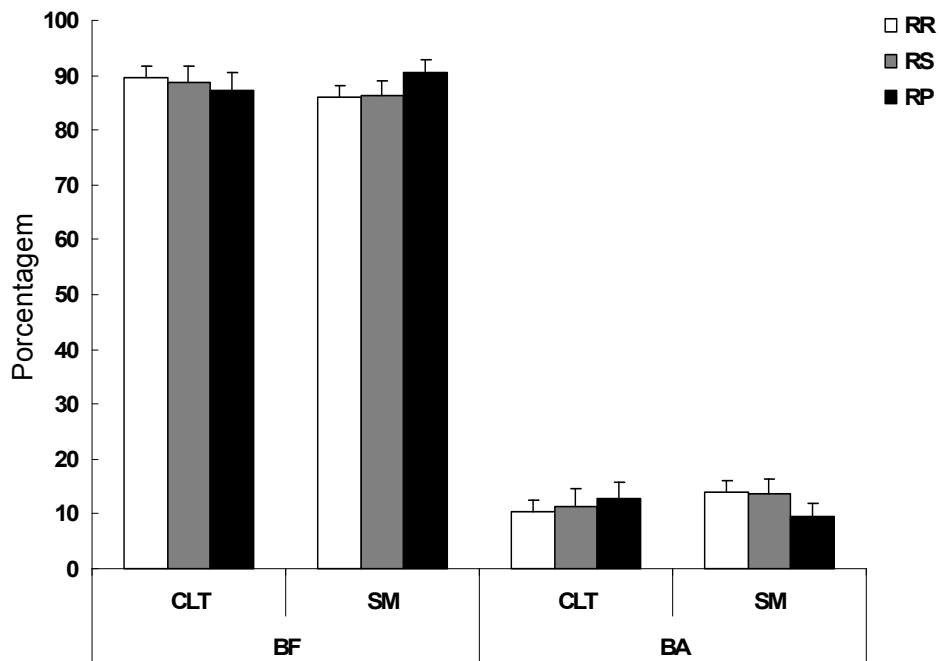


Fig. 14. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em fêmeas juvenis, amamentadas por mães alimentadas com dieta regular (RR), ou suplementadas com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=8; CTL+RS=7; CTL+RP=10; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10).

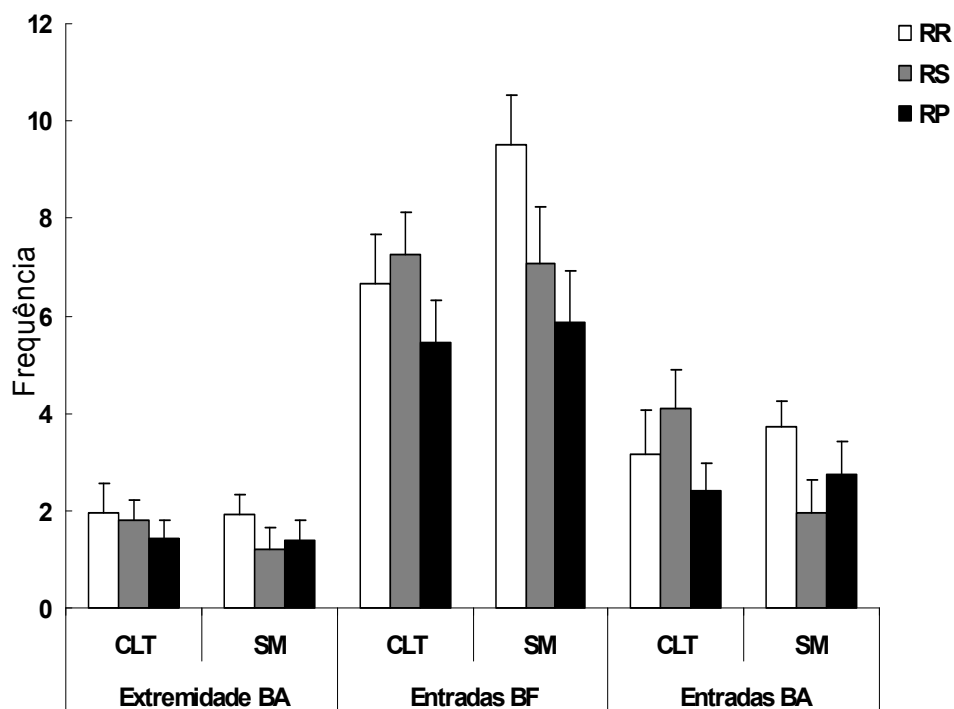


Fig. 15. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em machos juvenis amamentados por mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=10; CTL+RS=10; CTL+RP=9; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10).

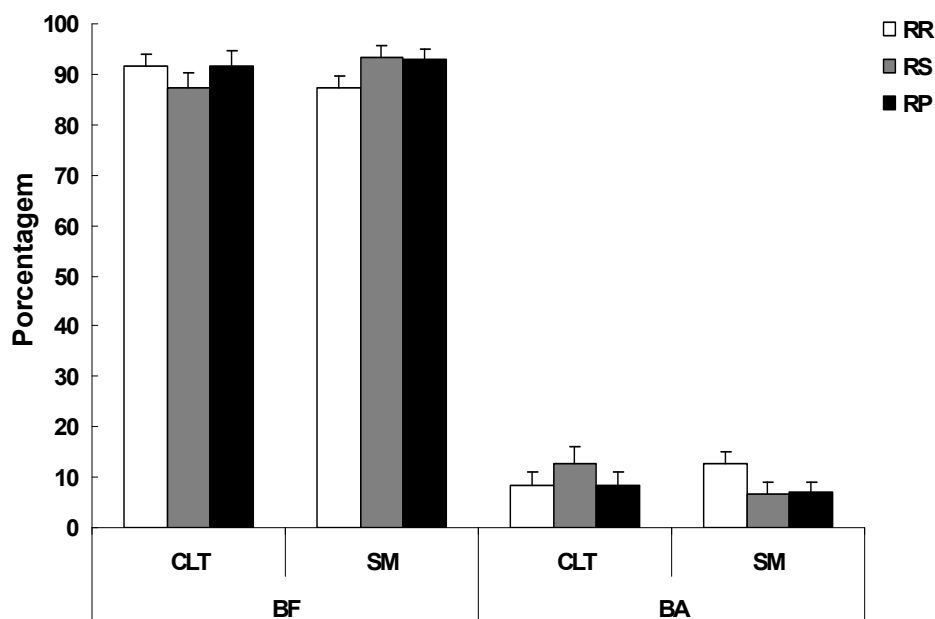


Fig.16. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em machos juvenis, amamentados por mães alimentadas com dieta regular (RR), suplementada com óleo de soja (RS) ou de peixe (RP). Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=10; CTL+RS=10; CTL+RP=9; SM+RR=10; SM+RS=10 e SM+RP=10).

4.1.3 – Filhotes Adultos

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A ausência de diferença nos parâmetros avaliados no LCE persistiu em fêmeas (Fig. 17 e 18) e machos (Fig. 19 e 20) na fase adulta. Não se observou qualquer efeito da manipulação (respectivamente, $F(7,59) = 0,50$, $p=0,83$); $F(7,55) = 0,4$, $p=0,87$) da dieta ($F(14,118) = 0,94$, $p=0,52$; $F(14,110) = 1,10$, $p=0,34$) ou da interação entre os fatores ($F(14,118) = 0,97$, $p=0,50$; $F(14,110) = 0,7$, $p=0,72$).

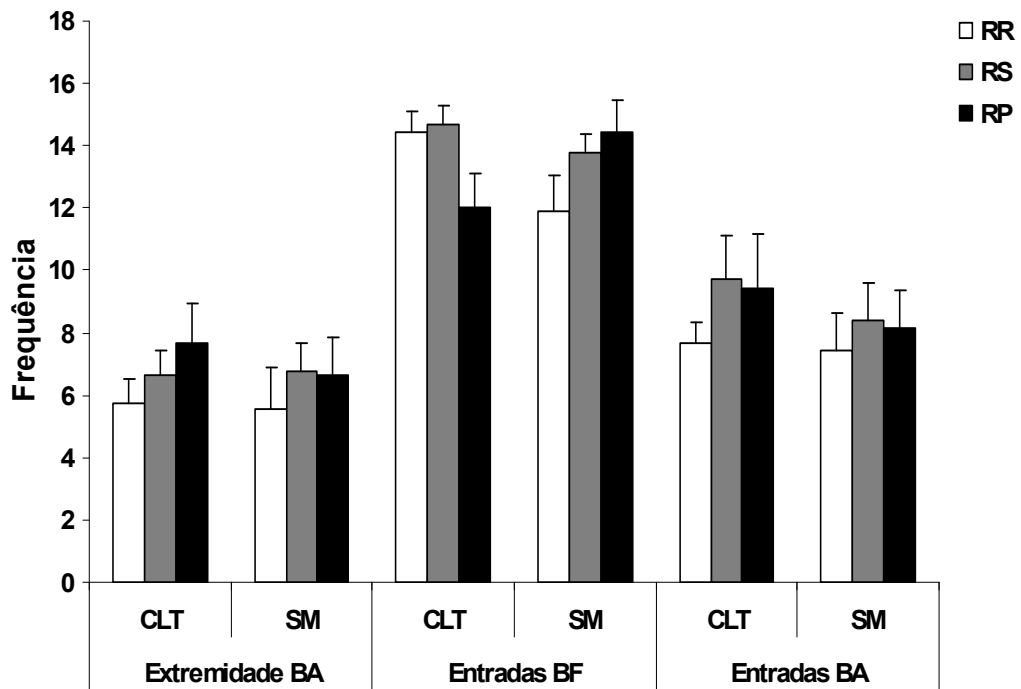


Fig. 17. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em fêmeas adultas amamentadas por mães alimentadas com dieta regular (n=14), suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são média \pm EPM de (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

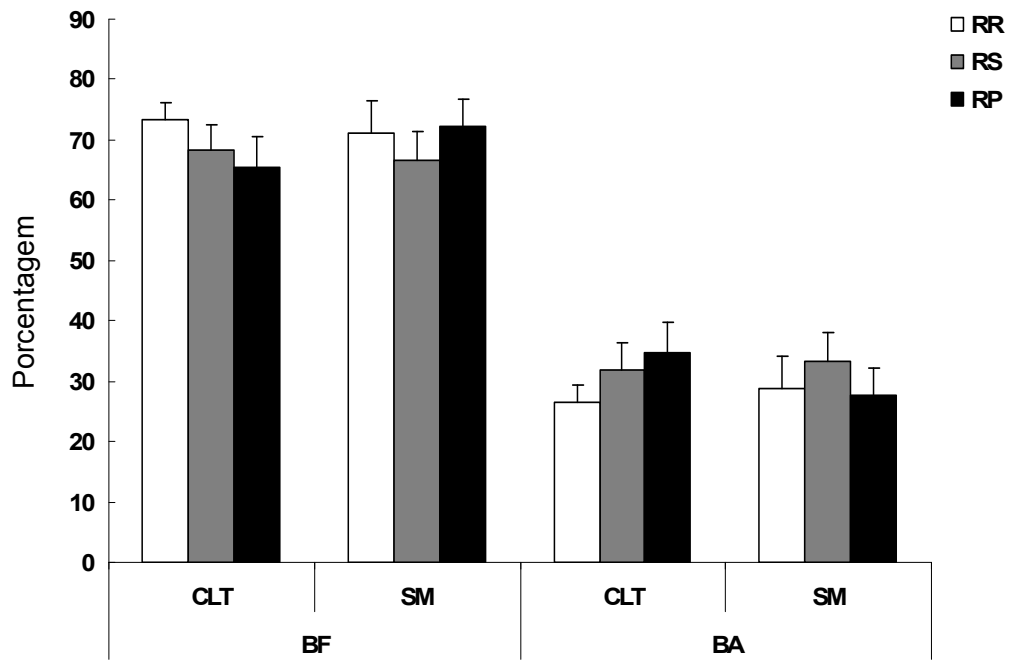


Fig. 18. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em fêmeas adultas, amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são expressos em média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

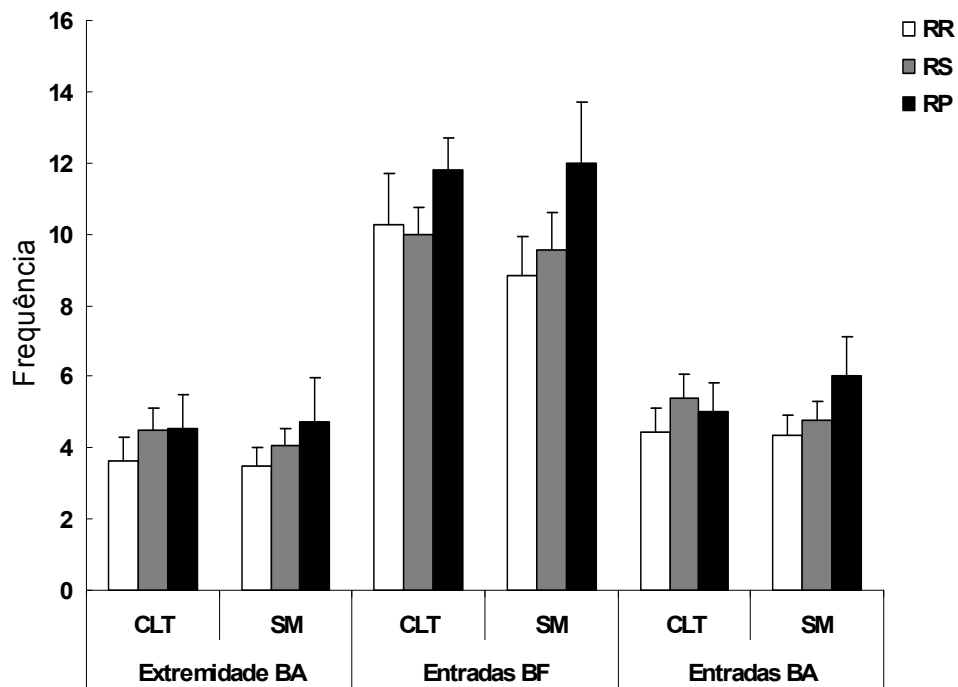


Fig.19. Número de entradas nos braços fechados e abertos no LCE quantificado em machos adultos amamentados por mães alimentadas com dieta regular (n=14), suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

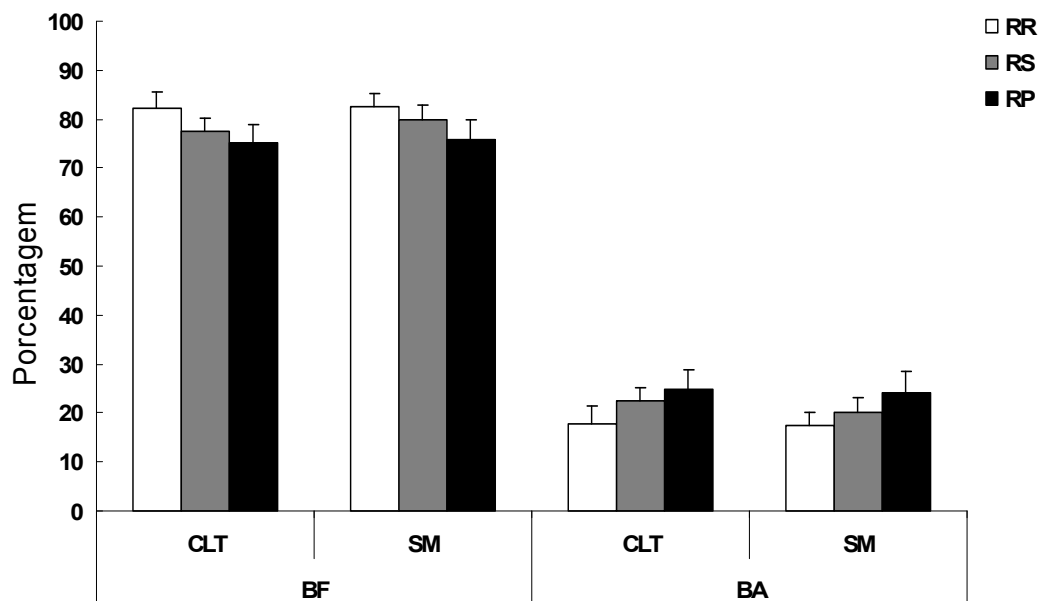


Fig. 20. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e fechados no LCE quantificado em machos adultos, amamentados por mães alimentadas com dieta regular, suplementada com óleo de soja ou de peixe. Todos os valores são expressos em média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

Teste do Nado Forçado (TNF)

Em fêmeas e machos avaliados no TNF na idade adulta (respectivamente Fig. 21 e 22), não se notou efeito da manipulação (respectivamente, $F(3,62) = 1,26$, $p=0,3$; $F(4,58) = 1,63$, $p=0,17$), da ração ($F(6,124) = 2,12$, $p=0,06$; $F(8,116) = 1,63$, $p=0,12$) ou da interação entre ambos ($F(6,124) = 0,75$, $p=0,61$; $F(8,116) = 0,95$, $p=0,47$) nos tempos de escalamento, imobilidade ou nado.

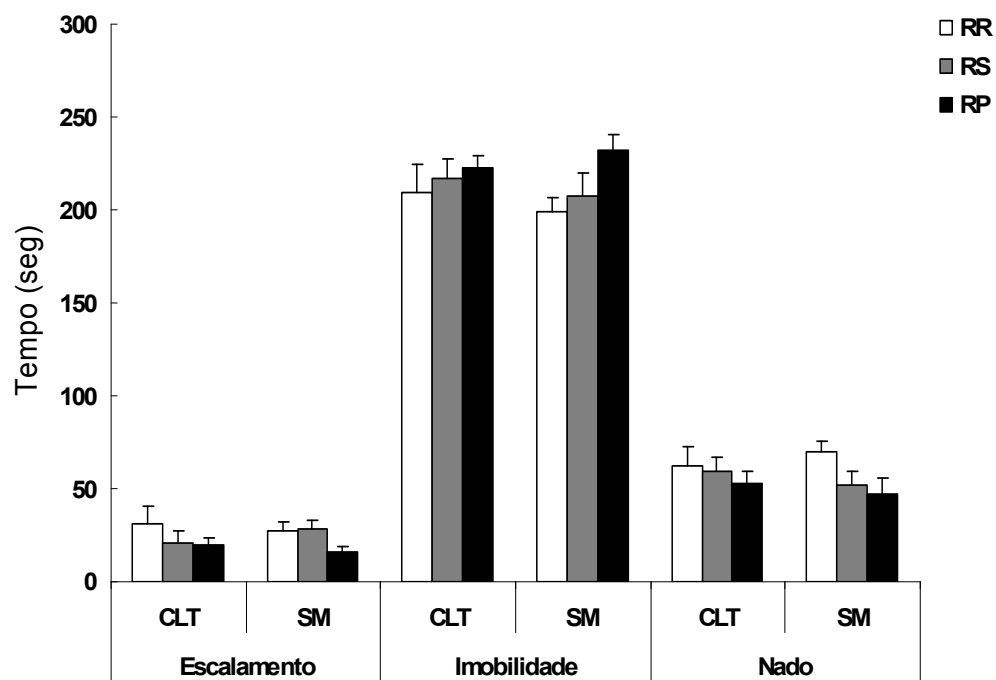


Fig. 21. Tempo de escalamento, imobilidade e nado em segundos no TNF, avaliados em fêmeas adultas amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe e submetidas ao procedimento de separação materna por 360 minutos. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

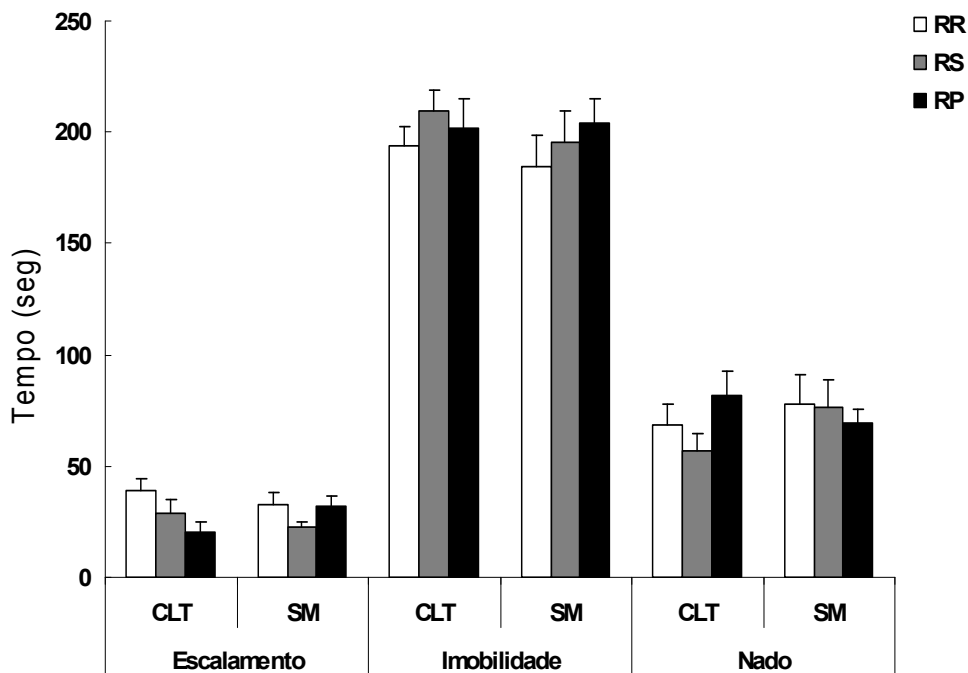


Fig. 22. Tempo de escalamento, imobilidade e nado em segundos no TNF, avaliados em machos adultos amamentados por mães alimentadas por dieta regular, com óleo de soja ou de peixe e submetidas ao procedimento de separação materna por 360 minutos. Todos os valores são expressos em média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

Também não se observou qualquer interferência dos fatores manipulação ($F(1,63) = 0$, $p=1$ para fêmeas e $F(1,59) = 1,01$, $p=0,31$ para machos), dieta ($F(2,63) = 0,84$, $p=0,43$ para fêmeas e $F(2,59) = 1,36$, $p=0,26$ para machos) ou da interação entre ambos ($F(2,63) = 1,86$, $p=0,17$ para fêmeas e $F(2,59) = 0,96$, $p=0,38$ para machos) na atividade locomotora dos animais.

4.2 - Avaliação das concentrações de corticosterona

4.2.1- Mães

Não foram observados efeitos da manipulação ($F(1,53) = 0,32, p=0,58$), ração ($F(2,53) = 2,30, p=0,11$) e nem a interação entre ambos os fatores ($F(2,53) = 0,49, p=0,61$) nas concentrações de corticosterona; também não foram notadas interações do tempo em relação à manipulação ($F(2,106) = 0,81, p=0,45$) e à ração ($F(4,106)=0,74, p=0,57$), ou da interação entre os três fatores ($F(4,106) = 0,46, p=0,77$).

Entretanto, observamos variações nas concentrações de corticosterona no decorrer do tempo ($F(2,106) = 61,05, p<0,01$), sendo que as concentrações basais e aos 60 min foram menores do que aquelas 15 min após o LCE (para ambos $p<0,01$). Contudo, as concentrações de corticosterona 60 min após o LCE ainda permaneciam acima das concentrações basais ($p<0,01$) (Fig. 23).

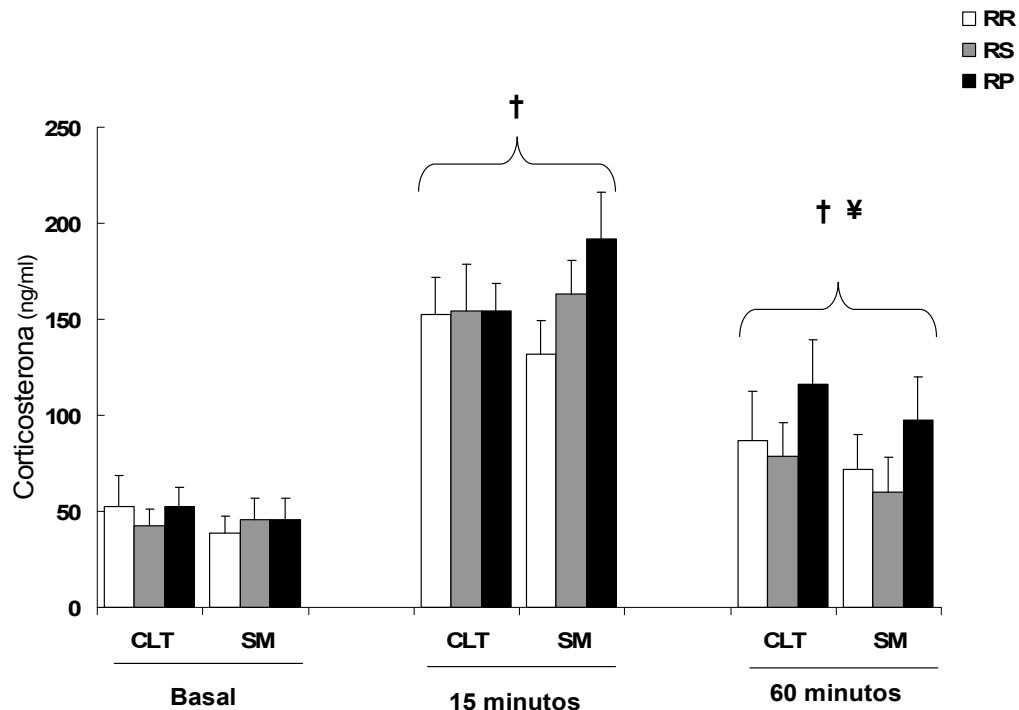


Fig.23. Concentrações de corticosterona basal, 15 ou 60 minutos após o teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado, em mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † $p < 0,05$ comparado ao basal; ¥ $p < 0,05$ comparado a 15 minutos após o LCE. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=7; CTL+RS=7; CTL+RP=8; SM+RR=7; SM+RS=8 e SM+RP=9)

4.2.2 – Filhotes juvenis

Nas fêmeas juvenis não foram observados efeitos da manipulação ($F(1,95)=2,61$, $p=0,11$) e da interação entre manipulação e ração ($F(2,95)=0,67$, $p=0,51$). O mesmo ocorreu para interação entre manipulação e tempo de coleta ($F(1,95)=0,22$, $p=0,64$) e para a interação entre os fatores manipulação, ração e tempo de coleta ($F(2,95)=0,07$, $p=0,93$). Entretanto, diferenças foram notadas em relação aos tipos de ração ($F(2,95)$, $p=0,01$), tempos de coleta ($F(1,95)=74,06$, $p<0,01$) e a interação entre ambos ($F(2,95)=8,34$, $p<0,01$)

Houve diferença significativa nas concentrações basais de corticosterona nos grupos suplementados com ração de peixe independente do tipo de manipulação pós-natal à qual foram submetidos, sendo que estes apresentaram menores concentrações em relação aos grupos suplementados com ração regular e de soja (para ambos $p < 0,01$). Também se verificou que as concentrações 15 min após o LCE eram maiores do que as basais ($p < 0,01$) (Fig. 24).

Quando comparamos a porcentagem de liberação de corticosterona das fêmeas juvenis submetidas ao LCE com aquelas que não passaram por este teste (Basal), observando desta forma a reatividade das fêmeas juvenis ao estresse, não se notou qualquer diferença entre os grupos ($F(1,48)=0,0005$, $p=0,98$) ou na interação entre grupo e ração ($F(2,48)=0,37$, $p=0,69$). Entretanto, houve diferença em relação à ração ($F(2,48)= 4,92$, $p=0,011$), sendo que as fêmeas adolescentes que foram amamentadas por mães que receberam RP apresentaram maior porcentagem de liberação de corticosterona em comparação com o grupo RS ($p < 0,01$) (Fig.25).

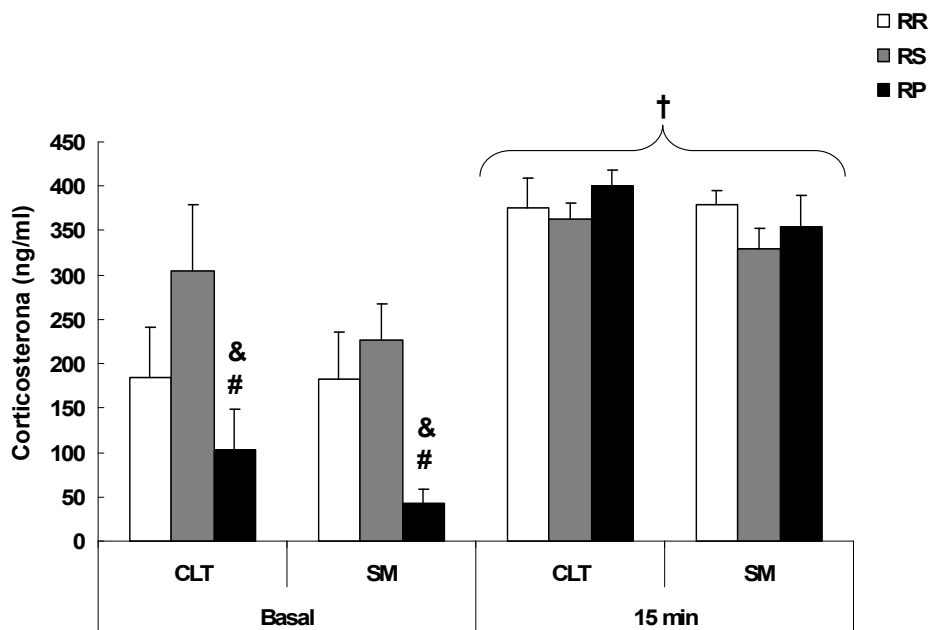


Fig.24. Concentrações de corticosterona basal e 15 min após o teste comportamental de LCE, em fêmeas juvenis amamentadas por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † $p < 0,05$ comparado ao basal; # $p < 0,05$ comparado ao grupo RR; & $p < 0,05$ comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=18; CTL+RS=16; CTL+RP=16; SM+RR=18; SM+RS=20 e SM+RP=19).

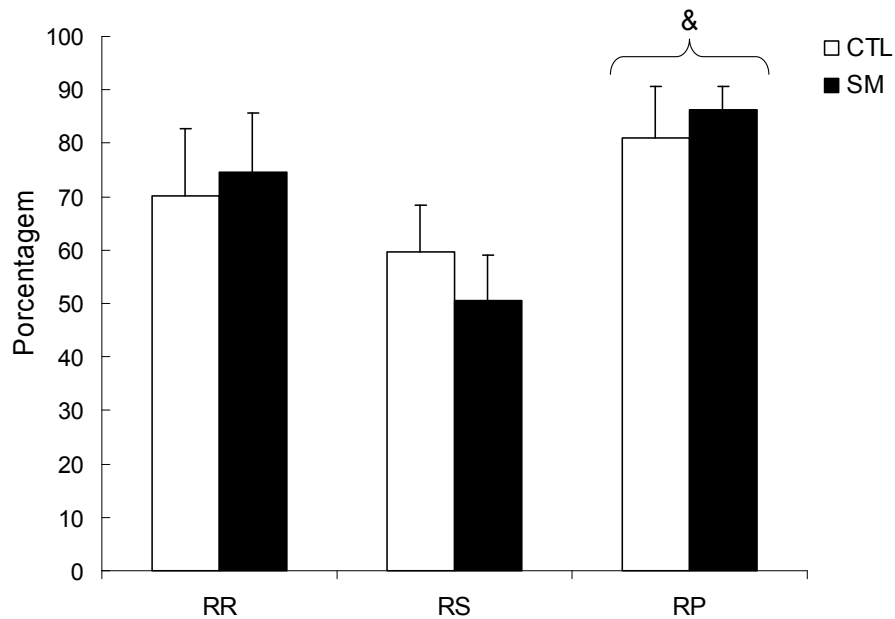


Fig.25. Porcentagem de liberação de corticosterona em relação aos valores basais em fêmeas juvenis amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidas ao procedimento de separação materna por 360 min. & $p < 0,05$ comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=18; CTL+RS=16; CTL+RP=16; SM+RR=18; SM+RS=20 e SM+RP=19).

Em machos juvenis não foram verificadas quaisquer diferenças em relação à manipulação ($F(1,97)=0,45$, $p=0,50$), ração ($F(2,97)=2,30$, $p=0,11$) e interações entre ração e manipulação ($F(2,97)=0,07$, $p=0,93$), ração e tempo de coleta ($F(1,97)=0,39$, $p=0,53$), manipulação e tempo de coleta ($F(2,97)=0,80$, $p=0,45$).

Apesar de as diferenças terem sido notadas quanto à interação entre os fatores manipulação, ração e tempo de coleta ($F(2,97)=3,21$, $p=0,04$), todas refletiram apenas a diferença entre os tempos de coleta ($F(1,97)=90,34$, $p<0,01$). Assim como nas fêmeas juvenis, as concentrações aos 15 min após o LCE foram maiores do que as basais ($p<0,01$) (Fig. 26).

Ao analisar a reatividade ao estresse dos machos adolescentes pela medida da porcentagem de liberação de corticosterona dos animais submetidos ao LCE em relação à secreção Basal, não se observou efeito de grupo ($F(1,52)=0,03$, $p=0,86$) ou da interação entre grupo e ração ($F(2,52)=2,91$, $p=0,063$). Entretanto, houve um efeito principal da ração ($F(2,52)= 10,99$, $p<0,01$), sendo que os adolescentes machos que foram amamentados por mães que receberam RP apresentaram maiores porcentagens de liberação de corticosterona comparados aos grupos RR e RS ($p<0,01$ para ambos) (Fig. 27).

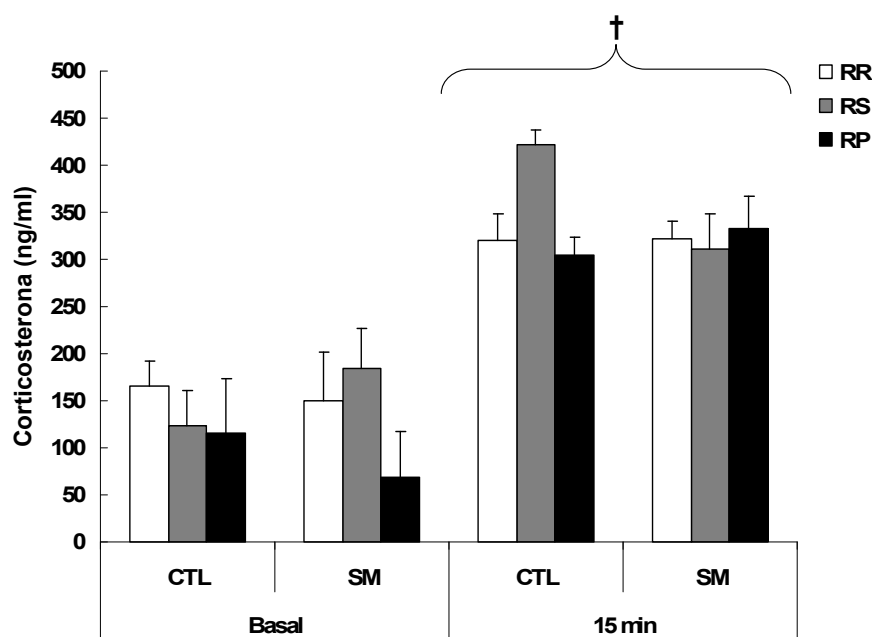


Fig. 26 Concentrações de corticosterona basal e 15 min após o teste comportamental de LCE, em machos juvenis amamentados por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † $p < 0,05$ comparado ao basal. Todos os valores são expressos como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=20; CTL+RS=18; CTL+RP=18; SM+RR=17; SM+RS=17 e SM+RP=19).

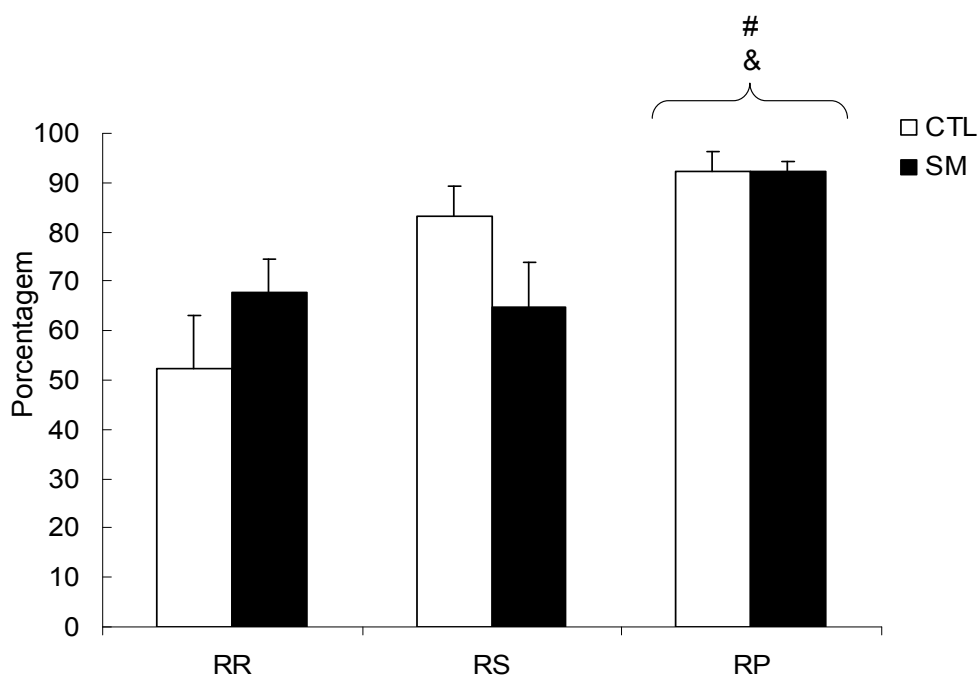


Fig.27. Porcentagem de liberação de corticosterona em relação aos valores basais em machos juvenis amamentados por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidos ao procedimento de separação materna por 360 min. # $p < 0,05$ comparado ao grupo RR; & $p < 0,05$ comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=20; CTL+RS=18; CTL+RP=18; SM+RR=17; SM+RS=17 e SM+RP=19).

4.2.3– Filhotes adultos

Quando se analisou as concentrações de corticosterona em na prole feminina adulta não foram observados efeitos da manipulação ($F(1,50)=1,53$, $p=0,224$), da ração ($F(2,50)=1,14$, $p=0,32$) e da interação entre manipulação e ração ($F(2,50)=0,55$, $p=0,57$). O mesmo ocorreu para interação entre manipulação e tempo de coleta ($F(2,100)=0,20$, $p=0,11$), manipulação e ração ($F(4,100)=2,36$, $p=0,057$) e para a interação entre os fatores manipulação, ração e tempo de coleta ($F(4,100)=1,68$, $p=0,15$). Apenas foi notada uma diferença em relação ao tempo de coleta tempos de coleta ($F(2,100)=149,2$, $p<0,01$), sendo que, as

concentrações 15 min após o LCE eram maiores do que as basais ($p < 0,01$), e as concentrações após 60min eram menores do que as de 15min ($p < 0,01$), porém sem se equiparar as concentrações basais ($p < 0,01$). (Fig.28)

Ao verificar a área sob a curva das concentrações de corticosterona para se observar se houve diferenças quanto a liberação deste hormônio ao longo do tempo, não se notou qualquer diferença entre os grupos ($F(1,54)=1,01$, $p=0,31$) ou na interação entre grupo e ração ($F(2,54)=3,49$, $p=0,037$). Entretanto, houve diferença em relação à ração ($F(2,52)= 1,67$, $p=0,01$), sendo que as fêmeas adultas que foram amamentadas por mães que receberam RP apresentaram maior de liberação de corticosterona em comparação com o grupo RS e RP ($p < 0,05$ para ambos). (Fig.29).

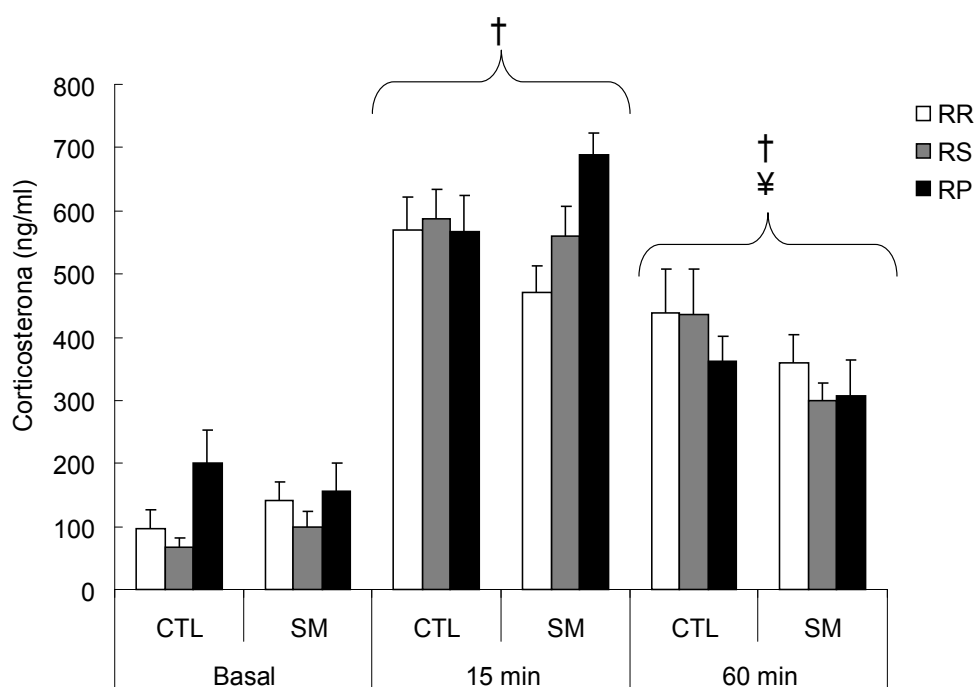


Fig.28. Concentrações de corticosterona basal, 15 ou 60 minutos após o teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado, de fêmeas adultas amamentadas por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. † $p < 0,05$ comparado ao basal; ‡ $p < 0,05$ comparado com 15 minutos após o LCE. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

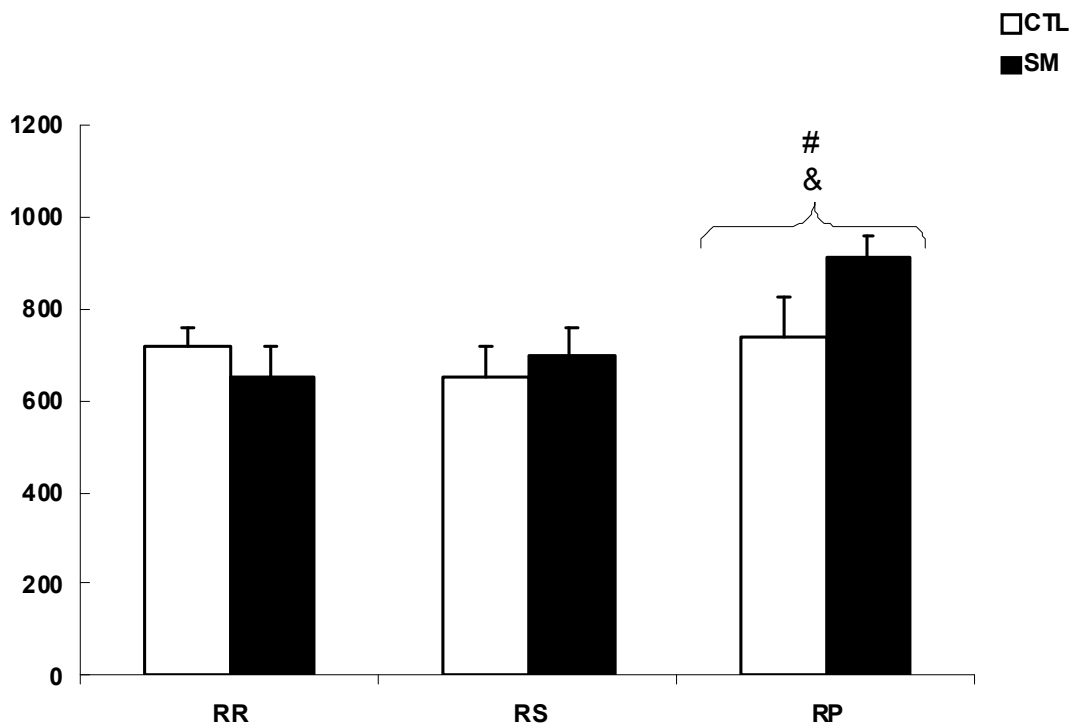


Fig. 29. Área sob a curva das concentrações de corticosterona (ng/ml/h) de fêmeas adultas amamentadas por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidos ao procedimento de separação materna por 360 min. # $p < 0,05$ comparado ao grupo RR; & $p < 0,05$ comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=12; CTL+RS=12; CTL+RP=12; SM+RR=11; SM+RS=12 e SM+RP=12).

Na prole masculina adulta, ao avaliar as concentrações de corticosterona não houve qualquer diferença em relação ao grupo ($F(1,50)=0,053$, $p=0,81$), ou interação entre o grupo e ração ($F(2,50)=0,33$, $p=0,71$). Entretanto, observou-se diferença quanto a ração ($F(2,50)=3,39$, $p=0,04$), ao tempo ($F(2,104)=226,85$, $p=0,04$), a interação entre tempo e ração ($F(4,104)=4,04$, $p<0,01$) e interação entre tempo, ração e tratamento ($F(4,104)=3,55$, $p=0,09$). Machos amamentados por mães que receberam RS apresentaram menores concentrações de corticosterona quando comparados ao grupo RR ($p=0,04$). Com relação ao tempo, as concentrações de corticosterona são maiores após 15min do teste em comparação ao basal e após 60min ($p<0,01$ para ambos) de teste, porém, as

concentrações após 60min não se igualaram aos níveis basais ($p < 0,01$). Após 60min ao LCE as concentrações de corticosterona do grupo RS e RP eram menores do que RR ($p < 0,01$ para ambos). Além disso, após 60min ao teste o grupo SM+RS apresentava menores valores de corticosterona comparado ao SM+RR ($p = 0,04$) e ao seu respectivo controle [CTL+RS] ($p = 0,03$). (Fig.30).

Ao observar área sob a curva das concentrações de corticosterona, não se notou diferenças entre os grupos ($F(1,50) = 0,053$ $p = 0,81$) ou na interação entre grupo e ração ($F(2,50) = 3,33$, $p = 0,71$). Entretanto, houve diferença em relação à ração ($F(2,50) = 3,39$, $p = 0,04$), sendo que os machos adultos que foram amamentados por mães que receberam RP apresentaram maior de liberação de corticosterona em comparação com o grupo RS ($p < 0,05$ para ambos) (Fig. 31).

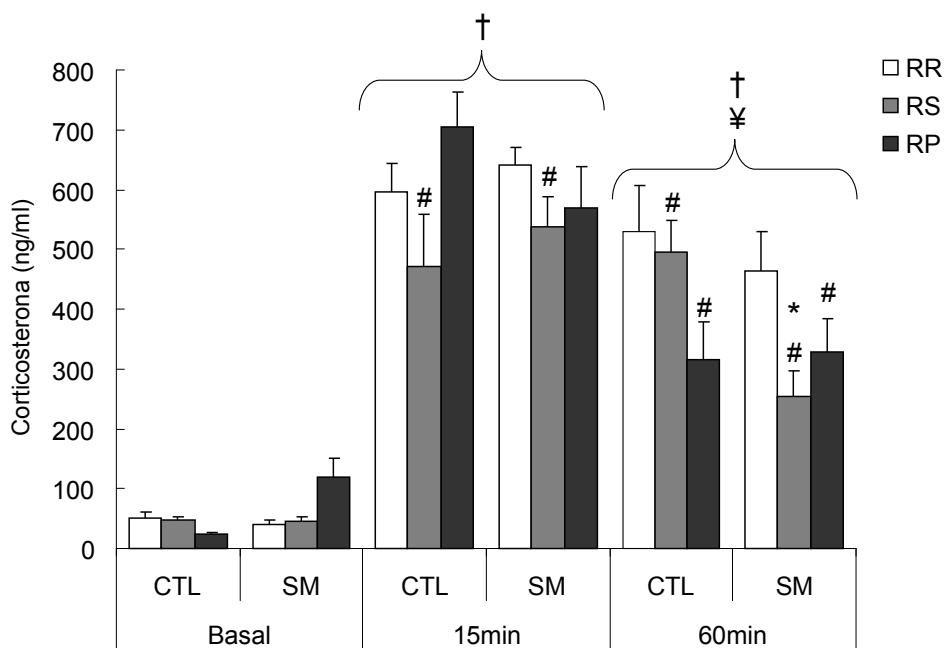


Fig. 30. Concentrações de corticosterona basal, 15 ou 60 minutos após o teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado, de machos adultos amamentados por mães submetidas a diferentes dietas e procedimentos pós-natais. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle; † $p < 0,05$ comparado ao basal; ‡ $p < 0,05$ comparado a 15 minutos após o LCE; # $p < 0,05$ comparado com RR. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=11; CTL+RS=12; CTL+RP=11; SM+RR=12; SM+RS=13 e SM+RP=8).

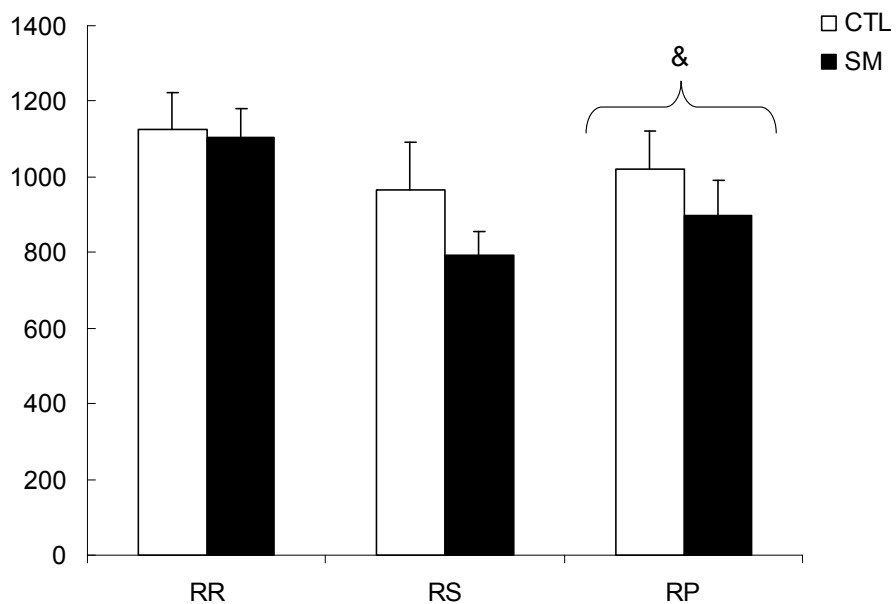


Fig. 31. Área sob a curva das concentrações de corticosterona de machos adultos amamentados por mães alimentadas com dieta regular, com óleo de soja ou de peixe, e submetidos ao procedimento de separação materna por 360 min. & p < 0,05 comparado ao grupo RS. Todos os valores são expressos como média ± EPM (N animais/grupo/dieta: CTL+RR=11; CTL+RS=12; CTL+RP=11; SM+RR=12; SM+RS=13 e SM+RP=8).

5- DISCUSSÃO

O presente estudo analisou as alterações comportamentais de filhotes na fase juvenil submetidos à SML por um período de 6 horas e em suas mães, no teste de LCE - comumente utilizado para verificar traços de perfil ansioso em animais (120) - e também no TNF - habitualmente usado para se avaliar comportamentos do tipo depressivo (117). Além disso, investigou a capacidade do ácido graxo poliinsaturado, n-3, fornecido às mães pela dieta, no período da lactação, em atenuar possíveis danos que o estresse da separação pudesse causar.

Ao analisar o comportamento das mães no LCE, observamos, contrariamente ao esperado, que aquelas submetidas a uma dieta enriquecida por n-3 apresentaram traços comportamentais de ansiedade. Ainda existem contradições na literatura a respeito das propriedades ansiolíticas do n-3. Vários trabalhos apontam para efeitos positivos (25,66) ou nulos (67, 121,122,123) do n-3 sobre a ansiedade, enquanto que apenas um estudo mostrou que mães de camundongos submetidas a uma dieta prolongada com n-3 também apresentaram um perfil tipicamente ansioso (124). Alguns antidepressivos que agem na inibição da receptação seletiva de serotonina (IRSS) aumentam a ansiedade nas primeiras semanas de uso, sendo este efeito observado tanto em humanos (125), quanto em animais tratados agudamente (126,127,128). Vários estudos são realizados para se compreender melhor os mecanismos neurobiológicos implicados na etiologia da ansiedade (129-138). Hipotetiza-se que um aumento da neurotransmissão serotoninérgica (5-HT) esteja associado com a indução de ansiedade, enquanto que a diminuição poderia induzir a ansiólise (138,139). Obviamente, a função da 5-HT é muito mais complexa, sendo que esta se altera de acordo com as regiões cerebrais envolvidas, e com os

paradigmas utilizados para avaliar ansiedade, emocionalidade e cognição (141,142,143). Muitos estudos que utilizam microdiálise têm demonstrado que uma única injeção de IRSS aumenta a concentração de 5-HT em regiões como o diencéfalo, córtex frontal e hipocampo em ratos (144,145). No presente estudo, os animais foram suplementados com n-3 por um período de três semanas, que poderia resultar em uma ação semelhante a estes antidepressivos. Sabe-se que o n-3 parece exercer alguma função sobre a neurotransmissão das monoaminas (122,146) e que a deficiência deste ácido graxo acarreta modificações significativas nas neurotransmissões dopaminérgica e serotoninérgica, aumentando a densidade de receptores 5HT₂ e diminuindo a de receptores D₂, além de reduzir as concentrações endógenas dessas monoaminas (147,148) sendo que a suplementação adequada com n-3 reverte estas alterações (149). Desta forma, parece que o n-3 poderia atuar, assim como os IRSS, na regularização da neurotransmissão de 5-HT causando a princípio aumento de ansiedade. Não podemos afirmar que o n-3 possui um mecanismo análogo ao dos IRSS; contudo, estudos apontam para aumento na liberação de 5-HT no córtex pré-frontal de animais suplementados com óleo de peixe (122).

O efeito ansiogênico do n-3 poderia ser atribuído também a uma deficiência na síntese de prostaglandinas D₂ (PGD₂). Os PUFAS são importantes na produção dos prostanoícos que atuam em vários processos fisiológicos, inclusive o inflamatório. A sua síntese inicia-se com a ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), em resposta a vários estímulos, hidrolisando os fosfolípidos das membranas celulares e liberando AA no citoplasma. Este, por sua vez, serve de substrato para duas vias enzimáticas: ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase. Pela via da COX são geradas as prostaglandinas (PGs) (149). O n-3 é precursor

de PGs trienoícos, como a PGD3 (43, 151), enquanto que o n-6 é precursor de PGE2 (152) e PGD2 (153), e ambos os PUFAs competem pelas mesmas enzimas como a COX-1, COX -2 e PLA2 na via metabólica de produção das PGs (43).

Alguns estudos indicam que a PGD2 participa na gênese da ansiedade. Camundongos com perfil do tipo-ansioso mostram uma diminuição da expressão de prostaglandina D2 sintase na matéria cinzenta periaquedutal e núcleo da estria terminal (154,155). Além disso, a administração de PGD2 intraventricular produz menor comportamento ansioso no LCE (156). Sendo assim, podemos sugerir que, devido à ingestão de uma dieta rica em n-3, houve um desvio na via metabólica de produção de PG, desfavorecendo a síntese de PGD2, propiciando o desenvolvimento de um comportamento ansioso nas mães.

Outro aspecto interessante notado foi o aumento no tempo de nado de mães que foram separadas de seus filhotes. Ao contrário desse resultado, os estudos têm mostrado que a SML produz um comportamento tipicamente depressivo em mães (11,157,158). Entretanto, nestas pesquisas o tempo de separação (180 minutos) e a linhagem dos animais (Sprague-Dawley) diferem daqueles utilizados no presente estudo. Estudos recentes realizados em mães da linhagem Wistar mostram que a SML causa redução do comportamento tipo-ansioso e aumento do cuidado da prole (12, 159,160). Além disso, alguns estudos indicam que fêmeas Wistar parecem ter maior resiliência ao estresse, não apresentando alteração comportamental (159,161) ou até mesmo uma redução do comportamento tipo-ansioso (163). Sendo assim, os resultados sugerem que mães da linhagem Wistar apresentam menor vulnerabilidade à SML e maior adaptabilidade a eventos aversivos.

Entretanto, o aumento no tempo de nado poderia ser interpretado de outra forma, como um reflexo do aumento da atividade motora. Estudos mostram que animais submetidos a estresse crônico variado (164,165), isolamento social (166,167) e estresse emocional de observar a exposição de outro rato a uma sessão de choque nas patas (168) apresentam hiperatividade. Dados na literatura mostram que animais expostos ao estresse por um longo período (ex. 360 min/dia durante 21 dias) apresentam aumento nos comportamentos emocionais relacionados à ansiedade, medo e depressão e déficits cognitivos (169-174), enquanto que períodos curtos ou médios de estresse (1 a 6h/dia por um período de 7 a 13 dias) não tem nenhum efeito ou mesmo produz efeitos opostos sobre o comportamento, causando inclusive aumento na atividade motora (175,176). Entretanto, quando estas mães foram avaliadas no LCE e no campo aberto, não houve qualquer alteração na atividade motora. Provavelmente isto se deve ao fato de que tais testes sejam encarados pelo animal como uma situação mais ansiogênica (177).

Entre os filhotes, independente do gênero, da dieta oferecida às mães e da manipulação pós-natal à qual foram submetidos nenhuma diferença comportamental foi observada no LCE. O efeito da separação materna na fase juvenil ainda é pouco estudado. Entre os trabalhos encontrados na literatura, os resultados são controversos, sendo que alguns estudos demonstram que a separação materna induz em machos juvenis o aumento do comportamento agressivo (16,19) e maior atividade locomotora em ambientes novos (17), enquanto que em fêmeas juvenis a separação materna não afeta a atividade locomotora no campo aberto (18). Nossos dados corroboram os de Rhees e

colaboradores (178), que não observaram qualquer diferença comportamental em animais juvenis de ambos os sexos no campo aberto.

Assim como os filhotes juvenis, os animais adultos não apresentaram qualquer alteração nos comportamentos avaliados no LCE e TNF. Vários estudos mostram que a separação materna causa efeitos tardios no comportamento de filhotes, os quais demonstram perfis de ansiedade (179; 180; 181) e depressão na vida adulta (94; 92; 182). Entretanto, outros estudos mostram efeitos positivos, com uma diminuição da ansiedade em filhotes adultos (183; 163) ou, assim como observado nos nossos animais, ausência de alteração comportamental (159,184;161, 185). Parece, assim, que não existe um consenso na literatura a respeito das consequências da SML em filhotes adultos. É possível que esta incoerência seja devida à grande variedade de maneiras em que a separação materna pode ser conduzida (186).

Como a manipulação, a dieta não pareceu influenciar o comportamento dos filhotes adultos. Como já discutido anteriormente, o n-3 parece exercer pouca influência no comportamento de animais avaliados no LCE (67,121,122,123). Contudo, uma série de trabalhos indicam que a suplementação com n-3 apresenta efeitos antidepressivos no TNF, resultando em redução no tempo de imobilidade destes animais (67,68,187,188,189). Contrariamente a estes resultados, há também estudos que mostram ausência de alteração comportamental no TNF quando esta suplementação é realizada por um curto período (190) ou cronicamente (191). Segundo Shaldubina e colaboradores (191) a falha da ação antidepressiva do n-3 no TNF poderia ser explicada pela sensibilidade seletiva que este teste tem para diferentes classes de antidepressivos. Por exemplo, drogas que aumentam a atividade central

dopaminérgica e α -adrenérgica reduzem o tempo de imobilidade, enquanto que drogas que agem principalmente sobre a serotonina são ineficazes (117). O TNF tem sido considerado um bom modelo preditivo para validação de fármacos como tricíclicos, inibidores de monoamina oxidase e antidepressivos atípicos como a bupropiona e mianserina (192). Contudo, os resultados no TNF para os IRSS são inconsistentes. Alguns estudos demonstraram que IRSS como a fluoxetina, paroxetina e o citalopram são eficazes no TNF (193,194), enquanto que outros mostram que esses IRSS não apresentam qualquer efeito neste modelo (195,117, 192,196).

Em relação às concentrações de corticosterona, o n-3 causou redução nas concentrações basais em fêmeas juvenis. Esta mesma tendência também foi observada nos machos, embora não de forma significativa. Alguns estudos prévios mostram que o n-3 diminui os efeitos da resposta inflamatória, assim como impede o aumento de secreção de corticosterona induzida pela administração de IL-1 (42,66). No entanto, machos e fêmeas juvenis amamentados por mães suplementadas com n-3 apresentaram maior reatividade ao estresse de exposição ao LCE, e isso parece ter persistido nas fêmeas na idade adulta. D'Asti e colaboradores (73) mostraram que filhotes com 10 dias de vida amamentados por mães que receberam uma dieta rica em n-3 apresentaram uma maior liberação de corticosterona após inalarem éter, sem que houvesse aumento comparável nas concentrações de ACTH. Sendo assim, sugere-se que o n-3 aumentaria a sensibilidade da adrenal ao ACTH (73) ou ainda, que o n-3 poderia agir de forma direta na adrenal, estimulando a esteroidogênese, assim como alguns ácidos graxos insaturados, como, por exemplo, o oléico e o linoléico (197).

Diferentemente dos animais juvenis e das fêmeas adultas, a dieta materna enriquecida com óleo de soja pareceu ter influenciado na diminuição das concentrações de corticosterona nos machos adultos. Trottier e colaboradores (71) mostraram que animais neonatos amamentados por mães que receberam uma dieta rica em gordura, apresentaram menor liberação de corticosterona e ACTH após serem submetidos à inalação de éter como estressor. Isto se deve ao fato de que a dieta rica em gordura promoveria aumento nos níveis de leptina o que protegeria contra a ativação excessiva do eixo HPA. (71). Este aumento dos níveis de leptina também é observado em filhotes de mães que receberam, durante o período de lactação, uma dieta enriquecida com óleo de soja, sendo que o mesmo não aconteceu para aqueles que foram amamentados por mães suplementadas com n-3 (198). Além disso, a influência desta dieta perinatal durante o período de desenvolvimento inicial mostra efeitos a longo prazo nos parâmetros metabólicos de animais adultos, especialmente, nos machos (199).

6-CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. Não houve interação entre a dieta recebida pelas mães com a manipulação pós-natal;
2. A separação materna por 360 min/dia aumentou a adaptabilidade das mães a eventos aversivos, enquanto que não produziu qualquer alteração comportamental nos filhotes juvenis e adultos;
3. O n-3 mostrou efeitos prejudiciais, provocando ansiogênese nas mães e aumentando a reatividade ao estresse em machos e fêmeas adolescentes, apesar de ter reduzido as concentrações basais de corticosterona em fêmeas juvenis.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rique ABR, Soares EA, Meirelles CA. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Med Esporte* 2002; 8: 244-254.
2. Dunstan JA, Mitoulas LR, Dixon G, Doherty DA, Hartmann PE, Simmer K, Prescott SL. The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. *Pediatr Res* 2007; 62: 689-694.
3. Anderson GL. Developmental sensitivity of the brain to dietary n-3 fatty acids. *J Lipid* 1994; 35: 105-111.
4. Innis SM. Fatty acid requirements of the newborn. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 1483-1492.
5. Hofer MA, Brunelli SA, Masmela J, Shair HN. Maternal interactions prior to separation potentiate isolation-induced calling in rat pups. *Behav Neurosci* 1995; 5: 1158–1167.
6. Liu D, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997; 277: 1659–1662.
7. Francis DD, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 1999; 286: 1155-1158.
8. Pryce CR, Feldon J Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats, manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 2003; 27:57-71.
9. Shair HN, Brunelli SA, Masmela JR, Boone E, Hofer MA. Social, thermal, and temporal influences on isolation-induced and maternally potentiated ultrasonic vocalizations of rat pups. *Dev Psychobiol* 2003; 42:206–222.

10. Zimmerberg B, Rosenthal AJ, Stark AC. Neonatal social isolation alters both maternal and pup behaviors in rats. *Dev Psychobiol* 2003; 42: 52–63.
11. Boccia ML, Razzoli M, Vadlamudi SP, Trumbulla W, Caleffie C, Pedersen CA. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. *Psychoneuroendocrino* 2007; 32: 65–67.
12. Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. Effects of maternal separation on baseline sleep and cold stress-induced sleep rebound in adult Wistar rats. *Sleep* 2004; 27:1146-1158.
13. Catallani B, Palma BD, Gil FZ, Suchecki D. Brief and long maternal separations decrease corticosterone secretion in a lupus-prone strain: dissociation from disease-related parameters. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 267-274.
14. Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. Long lasting alteration in REM sleep of female rats submitted to long maternal separation. *Physiol Behav* 2008; 93: 444 -452.
15. Michaels CC, Holtzman SG. Neonatal stress and litter composition alter sucrose intake in both rat dam and offspring. *Physiol Behav* 2006; 89: 735–741.
16. Arnold JL, Siviy SM. Effects of neonatal handling and maternal separation on rough-and-tumble play in the rat. *Dev Psychobiol* 2002; 41: 205–215.
17. Marin MT, Planeta CS. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. *Brain Res* 2004; 1013: 83-90.
18. Rees SL, Steiner M, Fleming AS. Early deprivation, but not maternal separation, attenuates rise in corticosterone after exposure to a novel environment in both juvenile and adult female rats. *Behav Brain Res* 2006, 175:383–391.

- 19.Veenema AH, Neumann ID. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats, *Psychoneuroendo* 2009; 34: 463–467.
- 20.Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. Long lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharm Biochem Behav* 2002; 73: 131–140.
- 21.Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. Maternal separation in rats lead to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 2004;19: 3–14.
- 22.Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev* 2010; 34: 821-834.
- 23.Khoury AE, Gruber SHM, Mork A, Mathe AA. Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr* 2006; 30: 535–540.
- 24.Appleton KM, Rogers PJ, Ness AR. Is there a role for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in the regulation of mood and behaviour? A review of the evidence to date from epidemiological studies, clinical studies and intervention trials. *Nutri Res Rev* 2008, 21: 13-41.
- 25.Buydens-Branchey L, Branchey M, Hibbeln JR Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation

and decreases in anger and anxiety in substance abusers. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32: 568–575.

26. McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosc* 1999; 22:105-122.

27. Graeff FG. Ansiedade. In: Graeff FG, Brandão ML, *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos Editorial; 1999. p. 135-177.

28. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936;138:32.

29. Cannon WB. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiol* 1914; 33:356-72.

30. Graeff, FG. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Rev Bras Psiquiatr* 2007; 29:3-6.

31. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 463–475.

32. Chrousos G, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis, *JAMA*, 1992, 267: 1244–1252.

33. Vasquez DM. Stress and developing limbic-hypothalamic-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinol* 1998; 23:663-700.

34. Weinstock M. Potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav and Immunity* 2005; 19:296-308.

35. Maccari S, Morley-Fletcher S. Effects of prenatal stress on the hypothalamus-pituitary and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinol* 2007, 32:10-15.

36. Joca SR, Padovan CM, Guimaraes FS. Stress, depression and the hippocampus. *Rev Bras Psiquiatr* 2003; 25: 46–51.

37. Spector AA. Essentiality of fatty acids. *Lipids*. 1999; 34: 1-3.
38. Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry* 2003 ; 48: 195-203.
39. Singh M. Essential fatty acids, DHA and human brain. *Indian J Pediatr* 2005, 72, 239-342.
40. Borsonelo EC, Galduróz JCF. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions. *Prostaglandin Leuk Essent Fatty Acids* 2008; 78:237-245.
41. Yehuda S. Omega-6/omega-3 ratio and brain-related functions. *World Rev Nutr Diet* 2003; 92:37-56.
42. Song C, Manku MS, Horrobin DF. Long-chain polyunsaturated fatty acids modulate interleukin-1 β -induced changes in behavior, monoaminergic neurotransmitters, and brain inflammation in rats, *J Nutr* 2008; 138: 954–963.
43. Arntzen KJ, Brekke OL, Vatten L, Austgulen R. Reduced production of PGE₂ and PGF₂ α from decidual cell cultures supplemented with N-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998; 56:183–195.
44. Das UN. Long-chain polyunsaturated fatty acid levels in the diet and red blood cell membranes of depressed patients. *J Affective Disorders* 1998, 48:149-155.
45. Haubner LY, Stockard JE, Saste MD, Benford VJ, Phelps CP, Chen LT. Maternal dietary docosahexanoic acid content affects the rat pup auditory system, *Brain Res* 2002; 58: 1-5.
46. Roegge CS, Widholm JJ, Engeseth NJ, Wang X, Brosch KO, Seegal RF, Schantz SL. Delayed spatial alternation impairments in adult rats following dietary n-6 deficiency during development. *Neurotoxicol Teratol* 2005; 27: 485–495.

47. Churchil MW, Jen KL, Dowhan LM, Adams BR, Hotra JW. Excess and deficient omega-3 fatty acid during pregnancy and lactation cause impaired neural transmission in rat pups. *Neurotoxicol Teratol* 2008; 30: 107–117.
48. 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* 2000; 47: 127-135.
49. Smuts, C M, Huang M, Mundy DI. A randomized trial of decosahexaenoic acid supplementation during the third trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 469-479.
50. Williams C, Birch EE, Emmert PM, Northstone K. Stereo acuity with at age 3-5 years in children born full term associated with pre-natal and post-natal dietary factors: a reporter from a population-based cohort study. *Am J Clin Nutr* 2001;73: 316-322.
51. Helland IB, Smith L, Saarem K. Maternal supplementation with long chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 2003, 111: 39-34.
52. Tanskanen A, Hibbeln JR, Tuomilehto J. Fish consumption and depressive symptoms in the general population in Finland. *Psychiatr Serv* 2001; 52: 529–531.
53. Silvers KM, Woolley CC, Hamilton FC, Watts PM, Watson RA. Randomised double-blind placebo controlled trial of fish oil in the treatment of depression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72: 211–218.
54. Suzuki S, Akechi T, Kobayashi M, Taniguchi K, Goto K, Sasaki S *et al.* Daily omega-3 fatty acid intake and depression in Japanese patients with newly diagnosed lung cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 787–793.

55. Timonen M, Horrobin DF, Jokelainen J, Laitinen J, Herva A, Rasanen P. Fish consumption and depression: the Northern Finland 1966 birth cohort study. *J Affect Disord* 2004; 82: 447–452.
56. Appleton KM, Peters TJ, Hayward RC, Heatherley SV, McNaughton SA, Rogers PJ *et al.* Depressed mood and n-3 polyunsaturated fatty acid intake from fish: non-linear or confounded association? *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 2007; 42: 100–104.
57. Maes M, Christophe A, Coyns P, Desnyder R, Meltzer HY. Fatt acid composition in major depression: decreased omega-3 fractions in cholesteryl esters and increased C20:4 omega6/ C20:5 omega3 ratio in cholesteryl esters and phospholipids. *J Affect Disord* 1996, 38:35-46.
58. Maes M, Christophe A, Delanghe J, Altamura C, Neels H, Meltzer HY. Lowered omega3 polyunsaturated acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. *Psychiatry Res* 1999; 85:275-291.
59. Edwards CR, Peet M, Shay J, Horrobin D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord* 1998, 48:149-155.
60. Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressed patients. *Biol. Psychiatry* 1998; 43:315-318.
61. Green P, Hermesh H, Monselise A, Marom S, Presburger G, Weizman A. Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16:107–113.

62. Su KP, Huang SY, Chiu CC, Shen WW. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder – a preliminary double-blind placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 267–271.
63. Fontani G, Corradeschi F, Felici A, Alfatti F, Bugarini R, Fiaschi AI *et al.* Blood profiles, body fat and mood state in healthy subjects on different diets supplemented with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Clin Invest* 2005;35:499–507.
64. Nemets H, Nemets B, Apter A, Bracha Z, Belmaker RH. Omega-3 treatment of children's depression: a controlled, double-blind pilot study. *Am J Psychiatry* 2006; 163:1098–1100.
65. Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. Mixture of essential fatty acids lowers test anxiety. *Nutr Neurosci* 2005; 8:265–267.
66. Song C, Li X, Leonard BE, Horrobin DF. 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* 2003; 44:1984–1991.
67. Ferraz AC, Kiss A, Araújo RL, Salles HM, 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 Leukot Essent Fatty Acids 2008; 78: 183–188.
68. Huang SY, Yang HT, Chiu CC, Pariante, Su KP. Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *J Psychiatr Res* 2006; 42:58-63.
69. Lakhwani L, Tongia SK, Pal VS, Agrawal RP, Nyati P, Phadnis P. Omega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in Wistar rats. *Acta Pol Pharm* 2007; 64:271-276.

70. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104 : 2S-8S.
71. Trottier G, Koski KG, Brun T. Increased fat intake during lactation modifies hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness in developing rat pups: A possible role for leptin. *Endocrinology* 1998; 139: 3704–3711.
72. Boukouvalas G, Antoniou K, Papalexi E, Kitraki E. Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. *Neuroscience*. 2008;153:373–382.
73. D'Asti, E, Long H, Tremblay-Mercier J, Grazier M. Maternal dietary fat determines metabolic profile and the magnitude of endocannabinoid inhibition of the stress response in neonatal rat offspring. *Endocrinology* 2010. [Epub ahead of print]
74. Borsonelo EC, Galduroz JCF. 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]. Universidade Federal de São Paulo; 2010.
75. McCauley J, Kern DE, Kolodner K, Dill L, Schroeder AF, De Chant HK. Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA* 1997; 277:1362–1368.
76. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ. Childhood parental loss and adult psychopathology in women: a twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 49: 109–116.
77. Sadowski H, Ugarte B, Kolvin I, Kaplan C, Barnes J. Early life family disadvantages and major depression in adulthood. *Br J Psychiat* 1999 ; 174 : 112–120.

78. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatry* 2001; 49: 1023–1039.
79. Beck, CT. Postpartum depression: a metasynthesis. *Qual Health Res* 2002; 12: 453–472.
80. Pauli-Pott U, Mertesacker B, Beckmann D. Predicting the development of infant emotionality from maternal characteristics. *Dev Psychopathol* 2004, 16, 19–42.
81. Cicchetti D, Rogosch FA, Toth SL. Maternal depressive disorder and contextual risk: contributions to the development of attachment insecurity and behavior problems in toddlerhood. *Dev Psychopathol* 1998; 10: 283–300.
82. Cogill SR, Caplan HL, Alexandra H, Robson KM, Kumar R. Impact of maternal postnatal depression on cognitive development of young children. *Br Med J* 1986; 292: 1165–1167.
83. NICHD. Early Child Care Research Network, Chronicity of maternal depressive symptoms, maternal sensitivity, and child functioning at 36 months. *Child Dev* 1999; 35: 129–1310.
84. Brennan PA, Hammen C, Andersen MJ, Bor W, Najman JM, Williams GM. Chronicity, severity, and timing of maternal depressive symptoms: relationships with child outcomes at age 5. *Dev Psychol* 2000; 36: 759–766.
85. Hendrick V. Treatment of postnatal depression. *BMJ* 2003; 327:1003–1004.
86. O'Brien LM, Heycock EG, Hanna M, Jones PW, Cox JL. Postnatal depression and faltering growth: a community study. *Pediatrics* 2004; 113: 1242–1247.

87. Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M, Cullen C, Schanberg S, Kuhn C. Prepartum, postpartum, and chronic depression effects on newborns. *Psychiatry* 2004; 67: 63-80.
88. Halligan SL, Herbert J, Goodyer IM, Murray L. Exposure to postnatal depression predicts elevated cortisol in adolescent offspring. *Biol Psychiat* 2004; 55: 376–381.
89. D'Amato FR, Cabib S, Puglisi-Allegra S, Patacchioli FR, Cigliana G, Maccari S, Angelucci, L. Effects of acute and repeated exposure to stress on the hypothalamo–pituitary–adrenocortical activity in mice during postnatal development. *Horm Behav* 1992; 26: 474–485.
90. Rosenfeld P, Wetmore JB, Levine S. Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav* 1992; 52: 787–791.
91. Avishai-Eliner S, Eghbal-Ahmadi M, Tabachnik E, Brunson KL, Baram TZ, 2001 Down-regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormonal messenger ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA. *Endocrinology* 2001; 142: 89–97.
92. Meaney M. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Ann Rev Neurosci* 2001; 24: 1161–1192.
93. Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. The effects of early rearing environment on the development of GABA A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacol* 1999; 22: 219–229.

94. Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK.. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 2002; 950: 52–63.
95. Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 2000; 122: 81–103.
96. Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 367–375.
97. Boccia ML, Pedersen CA. Brief vs. long maternal separation in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior, lactational levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrino* 2001; 26: 657–672.
98. Lovic V, Gonzalez A, Fleming AS. Maternally separate drats show deficits in maternal care in adulthood. *Dev Psychobiol* 2001; 39: 19–33.
99. Sisk CL, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence. *Nat. Neurosci* 2004; 7: 1040–1047.
100. Primus RJ, Kellogg CK. Gonadal hormones during puberty organize environment related social interaction in the male rat. *Horm Behav* 1990; 24:311–323.
101. Spear L.P. Neurobehavioral changes in adolescence. *Curr Dir Psychol Sci* 2000a; 9: 111–114.
102. Adriani W, Spijker S, Deroche-Gamonet V, Laviola G, Le Moal M, Smit AB. Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. *J Neurosci* 2003; 47: 12–6.

103. Tirelli E, Laviola G, Adriani W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2003; 27:163–178.
104. Spear, LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 2000b; 24: 417–463.
105. Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH, 2000. Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse* 2000; 37: 167–169.
106. Lee PR, Brady D, Koenig JI. Corticosterone alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression before puberty. *Mol Brain Res* 2003; 115: 55–62.
107. Teicher MH, Andersen SL, Hostetter Jr JC. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Dev Brain Res* 1999; 89: 167–172.
108. Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM. Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *J Comp Neurol* 2002; 453: 116–130.
109. Juraska, JM, Markham JA. The cellular basis for volume changes in the rat cortex during puberty: white and gray matter. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1021: 431–435.
110. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 427–451.
111. Barden AE, Dustan JA, Beilin LJ, Prescott SL, Mori TA. n-3 fatty acid supplementation during pregnancy in women with allergic disease: effect on blood pressure, and maternal and fetal lipids. *Clin Sci* 2006; 111: 289-294.

112. Malacrida C. R., Alterações de Óleo de Soja e da Mistura de Azeite de Dendê - Óleo de Soja em Fritura Descontínua de Batatas Chips, Braz J Food Tech 2003; 6: 245 – 249.
113. Nepomuceno DD, Dias Jr JCP, Moura ES, Rangel BOF, Correia EM, Figueiredo MSC, et al. Reutilização de óleo de frituras em dietas de cabras. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação; 2009; São José dos Campos: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação; 2009, p. 1-4.
114. Vieira FCV, Pierre CT, Castro HF. Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lípase pancreática. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica; 2005; Campinas: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica; 2005,p 1-6.
115. Sigma. Product Information: Sigma, 2007.1p.[CMH/NSB].
116. Touma C, Fenzl T, Ruschel J, Palme R, Holsboer F. Rhythmicity in Mice Selected for Extremes in Stress Reactivity: Behavioural, Endocrine and Sleep Changes Resembling Endophenotypes of Major Depression. PLoS ONE. 2009;3:e.
117. Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. Eur J Pharmacol 1979; 57:201–210.
118. Ottoni EB. EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. Beh Res Met, Inst & Comp 2000; 32:446-449.

119. Thrivikraman KV, Su Y, Plostsky PM. Patterns of Fos- Immunoreactivity in the CNS induced by repeated hemorrhage in conscious rats: correlations with pituitary-adrenal axis activity. *Stress* 1997; 2:145-158.
120. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci .Methods* 1985; 14: 149-167.
121. Nakashima Y, Yuasa S, Hukamizu Y, Okuyama H, Ohhara T, Kameyama T, Nabeshima T. Effect of a High Linoleate and a High Alpha-Linolenate Diet on General Behavior and Drug Sensitivity in Mice, *J Lipid Res* 1993; 34: 239–247.
122. Chalon, S, Delion-Vancassel S, Belzung C, Guilloteau D, Leguisquet AM, Besnard JC, Durand G. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *J Nutr* 1998; 129: 2512-2519.
123. Wilde MC, Farkas E, Gerrits M, Kiliaan AJ, Luiten PG. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 2002; 947: 166–173.
124. Fountain ED, Mao J, Whyte JJ, Mueller KE, Ellersieck MR, Will MJ. Effects of diets enriched in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on offspring sex-ratio and maternal behavior in mice, *Biol Reprod* 2008; 78: 211–217.
125. Londborg PD, Smith WT, Glaudin V, Painter JR. Low-dose clonazepam augmentation of fluoxetine: anxiety, sleep disturbance and core symptoms of depression. *J Affect Disord* 2000; 61: 73–79.
126. Silva MTA, Alves CRR, Santarem EMM. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 333-339.

127. Drapier D, Bentue-Ferrer D, Laviolle B, Millet B, Allain H, Bourin M, Reymann JM. Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Biochem Behav* 2007; 65: 209–216.
128. Silva RC, Brandão ML. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: An ethological analysis. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 65: 209–216.
129. Guimarães FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology* 1991; 103: 91–94.
130. Kopchia KL, Altman HJ, Commissaris RL. Effects of lesions of the central nucleus of the amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 43: 453-461.
131. Smythe J W, Murphy D., Timothy C, Costall B. Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior in rats. *Pharmacol. Biochem Behav* 1997; 56: 507-513.
132. Treit D, Menard J. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behav. Neurosci* 1997; 111: 653–658.
133. Andrade TGCS, Graeff FG. Effect of eletrolitic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on axiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70: 1-14.
134. Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 397-406.

135. Rex H, Thomas H, Hortnagl M, Fink VH. Behavioural and microdialysis study after neurotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74: 587–593.
136. Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28: 273–283.
137. Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharm* 2004; 15: 299–304.
138. Deaker MW, Curzon P, Brioni JD. Influence of separate and combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety and locomotor activity in rats. *Neurobiol Learn Mem* 1995; 64:156–168.
139. Briley M, Chopin P, Moret C. Effect of serotonergic lesion on “anxious” behaviour measured in the elevated plus-maze test in the rat. *Psychopharmacology* 1990; 101: 187–189.
140. Bagdy G, Graf M, Anheuer ZE, Modos EA, Kantor S. Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001;4: 399–408.
141. Handley SL, Mc Blane JW, Critchley MA, Njunge K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res* 1993; 58: 203–210.
142. Lin D, Parsons LH. Anxiogenic-like effect of serotonin (1B) receptor stimulation in the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 71: 581–587.

143. Salchner P, Singewald N. Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1238–1248.
144. Felton TM, Kang TB, Hjorth S, Auerbach SB. Effects of selective serotonin and serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors on extracellular serotonin in rat diencephalon and frontal cortex. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2003; 367: 297–305.
145. Boothman LJ, Mitchell SN, Sharp T. Investigation of the SSRI augmentation properties of 5-HT(2) receptor antagonists using in vivo microdialysis. *Neuropharmacology*. 2006; 50: 726–732.
146. Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, Nollet M. N-3 polyunsaturated fatty acids supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *J Lipid Res*. 2008; 49:340–334.
147. Delion S, Chalon S, Héroult J, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G. Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats, *J Nutr* 1994; 124: 2466–2476.
148. Kostas E, Galineau L, Bodard S, Vancassel S, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat, *J Neurochem* 2004; 89: 695–702.
149. Kostas E, Vancassel S, Lejeune B, Guilloteau D, Chalon S. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage, *J Lipid Res* 2002; 43: 1209–1219.
150. Baulouini M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94 556-563.

151. Tull S, Yates C, Maskrey B. Omega-3 fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment, *PLoS Biol.* 2009; 7: e1000177.
152. Calder PC, Immunomodulation by omega-3 fatty acids, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2007; 77: 327–335.
153. Vesin MF, Urade Y, Hayaishi O, Droz B. Neuronal and glial prostaglandin D synthase isozymes in chick dorsal root ganglia: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *J Neurosci* 1995; 15: 470–476.
154. Donner J, Pirkola S, Silander K, Kananen L, Terwilliger JD, Lonnqvist J. An association analysis of murine anxiety genes in humans implicates novel candidate genes for anxiety disorders. *Biol.Psychiatry* 2008; 64: 672–680.
155. Hovatta I, Tennant RS, Helton R. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 2005; 438: 662– 666.
156. Zhao H , Ohinata K, Yoshikawa M, Central prostaglandin D2 exhibits anxiolytic-like activity via the DP1 receptor in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009; 88:68–72.
157. Manian J, Morris MJ. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. *Behav Brain Res* 2010; 208: 72-79.
158. Sung YH, Shin MS, Sehyung C, Baik HH, Jin BK, Chang HK, Lee EK, Kim CK. Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. *Neurosc Lett* 2010; 470: 86-90.

159. Marmendal M, Roman E, Eriksson CJ, Nylander I, Fahlke C. Maternal separation alters maternal care, but has minor effects on behavior and brain opioid peptides in adult offspring, *Dev Psychobiol*, 2004; 45: 140–152.
160. Eklund MB, Johansson LM, Uvnäs-Moberg K, Arborelius L. Differential effects of repeated long and brief maternal separation on behaviour and neuroendocrine parameters in Wistar dams. *Behav Brain Res* 2009; 1: 69-25.
161. Roman E, Arborelius L. Male but not female Wistar rats show increased anxiety-like behaviour in response to bright light in the defensive withdrawal test. *Behav. Brain Res* 2009; 202:303-307.
162. Mitra R, Vyas A, Chatterjee G, Chattarji S. Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats, *Neurosci Lett* 2005; 383: 278–283.
163. Eklund MB, Arborelius L. Twice daily long maternal separations in Wistar rats decreases anxiety-like behaviour in females but does not affect males. *Behav Brain Res* 2006; 172: 278–285.
164. Gronli J, Murison R, Eldbjorg F, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions, *Physiol Behav* 2004 ; 2005:571–577.
165. Hirotaka S, Kazushige M. Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats *Behavi Brain Res* 2010 [Epub ahead of print]
166. Heidbreder IC, Weiss AM, Domeney C, Pryce J, Homberg G, Hedou J, *et al.* Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 2000; 100: 749–768.

167. Sciolino NR, Bortolato M, Eisenstein SA, Fu J, Oveisi F, Hohmann AG, Piomelli D. Social isolation and chronic handling alter endocannabinoid signaling and behavioral reactivity to context in adult rats, *Neuroscience* 2010 [Epub ahead of print]
168. Pijlman FTA, Wolterink G, van Ree JM. Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats, *Behav Brain Res* 2003; 139:131–138.
169. Bowman RE, Ferguson D, Luine VN. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience* 2002;113:401–10.
170. Bowman RE, Beck KD, Luine VN. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav* 2003; 43: 48–59.
171. Conrad D, Grote KA, Hobbs RJ, Ferayorni A. Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress, *Neurobiol Learn Mem* 2003; 79: 32–40.
172. Kleen JK, Sitomer MT, Killeen PR, Conrad CD. Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore, *Behav Neurosci* 2006; 120: 842–851.
173. McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms, *Brain Res* 2007; 1161:56–64.
174. Sandi C., Merino JJ, Cordero MI, Touyarot K, Venero C. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the

neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1, *Neuroscience* 2001;102: 329–339.

175. Luine VN, Martinez C, Villegas M, Magariños AM, McEwen BS. Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance, *Physiol Behav* 1996; 59: 27–32.

176. Thorsell A, Carlsson K, Ekman R, Heilig M. Behavioral and endocrine adaptation, and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress, *Neuroreport* 1999;10:3003–3007.

177. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice, *Behav Brain Res* 2002; 134: 49–57.

178. Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive behavior. *Behav Brain Res* 2001; 123:1-10.

179. McIntosh, J., Anisman, H., Merali, Z., 1999. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev. Brain Res.*, 113, 97–106.

180. Daniels, W.M., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E., Stein, D.J., 2004. Maternal separation in rats lead to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab. Brain Dis.*,19, 3–14.

181. Lee, J.H., Kim, H.J., Kim J.G., Ryu, V., Kim, B.T., Kang, D.W., Jahng J.W., 2007. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation, *Neurosci. Res.* 58, 32–39.

182. Sanchez, M.M.; Ladd, C.O.; Plotsky, P.M., 2001. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev. Psychopathol.*, 13, 419–449.
183. Ploj, K., Roman, E., Nylander, I., 2002. Effects of maternal separation on brain nociceptin/orphanin FQ peptide levels in male Wistar rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 123-129.
184. Shalev, U., Kafkafi, N., 2002. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 115-122.
185. Stevenson, C.W., Marsden, C.A., Mason R., 2008. Early life stress causes FG-7142-induced corticolimbic dysfunction in adulthood, *Brain Res.* 1193, 43–50.
186. Lehmann, J., Feldon, J., 2000. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: Consistent or confusing? *Rev. Neurosci.*, 11, 383-408.
187. Lakhwani, L.T, ongia, S.K., Pal, V.S., Agrawal, R.P., Nyati, P., Phadnis, P., 2007. Omega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in Wistar rats. *Acta Pol. Pharm.*, 64, 271-276.
188. Naliwaiko, K., Araujo, R.L.F., 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.K., 2004. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant?, *Nutr. Neurosci.*, 7, 91–99.
189. Venna, V. R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., Bordet, R., 2009. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrino.* 34, 199-211.
190. Carlezon, W.A., Mague, S.D., Parow, A.M., Stoll, A.L., Cohen, B.M., Renshaw P.F., 2005. Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty

acids are potentiated by combined treatment in rats. *Biol. Psychiatry.* 57, 343–350.

191. Shaldubina, A., Nemets, B., Bersudsky, Y., 2002. Lack of effect of eicosapentaenoic acid in Porsolt forced swimming test model of depression. *Acta Neuropsychol.*, 14, 203–206.

192. Danysz, W.; Plaznik, A.; Kostowski, W.; Malatynska, E.; Jarbe, T.U.; Hiltunen, A.J.; Archer, T., 1988. Comparison of desipramine, amitriptyline, zimeldine and alaproclate in six animal models used to investigate antidepressant drugs. *Pharmacol Toxicol.* 62, 42–50.

193. Renard, C.E., Fiocco, A.J., Clenet, F., Hascoet, M., Bourin, M., 2001. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? *Psychopharmacol.*, 159, 42–50.

194. Redrobe, J.P., Bourin, M., 1998. Dose-dependent influence of buspirone on the activities of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacol.* 138, 198–206.

195. Gorka, Z., Wojtasik, E., Kwiatek, H., Maj, J., 1979. Action of serotoninmimetics in the behavioral despair test in rats. *Commun. Psychopharmacol.* 3, 133–136.

196. Takamori, K., Yoshida, S., Okuyama S., 2001. Availability of learned helplessness test as a model of depression compared to a forced swimming test in rats. *Pharmacol.* 63, 147–153.

197. Sarel I, Widmaier EP., 1995. Stimulation of steroidogenesis in cultured rat adrenocortical cells by unsaturated fatty acids. *Am J Physiol*; 268: R1484–R1490.

198. Korotkova M, Gabrielsson B, Lönn M, Hanson LA, Strandvik B, 2002. Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to alpha-linolenic acid in the maternal diet. *J Lipid Res.* 43, 1743-1749.

199. Korotkova M, Gabrielsson BG, Holmäng A, Larsson BM, Hanson LA, Strandvik B, 2005. Gender-related long-term effects in adult rats by perinatal dietary ratio of n-6/n-3 fatty acids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288, 575-579.

Abstract

Several studies have shown that polyunsaturated fatty acids, specially omega-3, or n-3, are essential for good health and for normal development. Such compounds, along with their active metabolites, are also important to the structural and physiological maintenance of the central nervous system throughout development, mainly during the initial phases of life. Therefore, we studied the effects of n-3 supplementation on dams and pups submitted the long maternal separation (LMS, 360 min long), from 2 to 14 post natal day (pnd). This is a stressfull stimulus to both parts. Pregnant female Wistar rats, 10-weeks old, were separated into 6 groups: 1) Control (CTL) + regular diet; 2) CTL + soy oil; 3) CTL + fish oil (n-3); 4) LMS + regular diet; 5) LMS + soy oil; 6) LMS + n-3. The supplementation was kept from birthday to weaning, which occurred on pnd 21. Three days after weaning, dams were exposed to the Elevated Plus Maze (EPM), as did the pups, on pnd 31, and three days after the Elevated Plus Maze, dams were evaluated on the Forced Swimming Test (FST). From PND 83, male and female pups were challenged on EPM and FST. The behavioral consequences of the separation were expressive on dams, but had little influence on the emotionality of young males and females. Surprisingly, n-3 caused an ansiogenic effect on mothers, and failed to cause any effect on pups' behavior. However, there was a reduction of the basal concentration of corticosterone in young females and an increased reactivity to stress in both male and female adolescents.