

Impacto da exposição pós-natal crônica ao estresse sobre o comportamento ansiogênico de ratos jovens induzidos pela desnutrição *in utero*

Impact of chronic postnatal exposure to stress on the anxiogenic behavior of young rats induced by undernutrition in utero

ABSTRACT

Exposure to stress and undernutrition alone are important risk factors in the development of neurobehavioral disorders. However, few studies focus on how chronic postnatal stress affects adaptive behavioral response to undernutrition *in utero*. **Objective:** to investigate whether chronic postnatal stress exposure constitutes a risk factor in addition to undernutrition *in utero* to developing neurobehavioral disorders in young rats. **Methods:** we evaluated the overall activity in the Open Field, and anxiety in the Elevated Plus Maze of male Wistar rats (35 days) from dams submitted or not to food restriction (50%) throughout pregnancy and exposed or not to restraint stress (single sections 1 h/day, 5 days/week for 2 weeks from weaning). **Results:** postnatal stress and undernutrition *in utero*, alone and in combination, did not cause changes to the young rats behavior, except for a decrease of locomotion in the central and middle zone of the Open Field in the offsprings subjected to undernutrition *in utero*. The postnatal stress, alone and in combination, did not change the activity in Elevated Plus Maze. However, the time spent in the open arms decreased while the time in the closed arms increased in undernourished rats *in utero*. The anxiety index was decreased by undernutrition *in utero*. **Conclusion:** the absence of behavioral changes in young rats exposed to undernutrition *in utero* in association with chronic postnatal stress suggests that the physiological changes that lead to anxiogenic condition induced by undernutrition *in utero* alone take place mainly during the postnatal development.

Keywords: Undernutrition *in utero*. Postnatal stress. Behavior. Young rats.

RESUMO

Exposição ao estresse e desnutrição, isoladamente, são importantes fatores de risco no desenvolvimento de transtornos neurocomportamentais. Entretanto, poucos estudos focam como o estresse pós-natal crônico afeta a resposta comportamental adaptativa à desnutrição *in utero*. **Objetivo:** investigar se a exposição pós-natal crônica ao estresse constitui-se em fator de risco adicional à desnutrição *in utero* para o desenvolvimento de transtornos neurocomportamentais em ratos jovens. **Métodos:** avaliou-se a atividade geral, em Campo Aberto, e a ansiedade, no Labirinto em Cruz Elevado, de ratos machos Wistar (35 dias) provenientes de ratas submetidas ou não à restrição alimentar (50%) durante toda a prenhez, e expostos ou não ao estresse de contenção (seções únicas 1 h/dia, 5 dias/semana, durante 2 semanas a partir do desmame). **Resultados:** o estresse pós-natal e a desnutrição *in utero*, isoladamente e em associação, não determinaram alterações no comportamento de ratos jovens, exceto pela diminuição da locomoção na zona central e mediana do Campo Aberto em proles submetidas à desnutrição *in utero*. O estresse pós-natal, isoladamente e em associação, não alterou a atividade no Labirinto em Cruz Elevado. Entretanto, o tempo de permanência nos braços abertos diminuiu enquanto o tempo nos braços fechados aumentou em ratos desnutridos *in utero*. O índice de ansiedade foi diminuído pela desnutrição *in utero*. **Conclusão:** a ausência de alterações comportamentais em ratos jovens expostos à desnutrição *in utero* em associação ao estresse pós-natal crônico sugere que as alterações fisiológicas que levam à condição ansiogênica induzida pela desnutrição *in utero*, isoladamente, têm lugar principalmente durante o desenvolvimento pós-natal.

Palavras-chave: Desnutrição *in uter*. Estresse. Comportamento. Ratos jovens.

Andréia Pereira de Souza¹,
José Sérgio Possomato-Vieira¹,
Sandra Cordellini^{1*}

¹Departamento de Farmacologia,
Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista -
UNESP, Botucatu-SP, Brasil

***Dados para correspondência:**
Sandra Cordellini
Departamento de Farmacologia,
Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista -
UNESP - Distrito de Rubião Júnior,
s/n, CEP 18618-970, Botucatu-SP,
Brasil
E-mail: cordelli@ibb.unesp.br

INTRODUÇÃO

A exposição a condições hostis (estressores) resulta em uma série de respostas coordenadas no sentido de aumentar a probabilidade de sobrevivência. Estas respostas coordenadas são conhecidas como respostas adaptativas e refletem alterações no comportamento, na função do sistema autonômico, na secreção de vários hormônios, entre outras. A perda da resposta adaptativa ao estresse é considerada uma das causas neuropatológicas primárias das doenças relacionadas ao estresse. Estudos experimentais mostram que na exposição crônica a um único tipo de estressor (homotípico) os animais tendem a se habituar.¹⁻⁴ O processo de habituação pode possivelmente ser atribuído à liberação de adaptógenos endógenos em resposta aos episódios repetidos de exposição ao estresse.⁵ Contrariamente, Figueiredo et al. (2003)⁶ relatam que a exposição crônica ao predador determina um padrão único de ativação neuroendócrina, caracterizado pela sensibilização da resposta integrada da corticosterona, através do aumento da síntese e do tempo de secreção. Sendo assim, os processos de habituação e sensibilização dependem das características do estresse, a saber, duração e frequência de exposição, qualidade e intensidade do agente estressor, entre outros.^{7,8}

Em relação às respostas comportamentais adaptativas ao estresse temos: aumento do comportamento de ansiedade em camundongos submetidos ao estresse crônico social de isolamento⁹; diminuição da atividade locomotora em ratos expostos ao estresse agudo de imersão em água gelada por 5 minutos³; aumento do comportamento de ansiedade ao estresse de apresentação ao predador em ratos.¹⁰

Semelhantemente ao estresse, a desnutrição acarreta alterações comportamentais significativas, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de transtornos neurocomportamentais. Ainda, muitas doenças desenvolvidas durante a vida adulta, são provavelmente determinadas durante os primeiros estágios da vida, sob os efeitos da exposição ou dieta preferencial materna durante a prenhez, o que pode alterar de modo significativo a evolução dos processos fisiopatológicos. No que se refere à desnutrição perinatal, esta condição determina

distúrbios de memória, aprendizagem, desempenho cognitivo, entre outros.^{4,11}

Enquanto muitos estudos examinam a resposta neurocomportamental à exposição ao estresse e à desnutrição *in utero* isoladamente, o potencial para a interação entre estas condições pode ser postulado em diversos contextos, por exemplo, situações nas quais múltiplos fatores de risco afetam um sistema comum levando a danos sustentados ou cumulativos. Entretanto, a literatura ainda apresenta poucos estudos focando o modo como o estresse crônico pós-natal afeta a resposta comportamental adaptativa à desnutrição *in utero*.

OBJETIVO

Investigar se a exposição pós-natal crônica ao estresse constitui-se em fator de risco adicional à desnutrição *in utero* para o desenvolvimento de transtornos neurocomportamentais em ratos jovens.

Para tanto, a atividade geral, em Campo Aberto, e a ansiedade, no Labirinto em Cruz Elevado, foram avaliadas em ratos machos Wistar de 35 dias de vida pós-natal submetidos ou não à desnutrição *in utero* e ao estresse crônico pós-natal de contenção, isoladamente e em associação.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Ratos Wistar, machos e fêmeas, com 12 a 16 semanas de idade, foram utilizados para o acasalamento. Os animais foram provenientes do Biotério da UNESP-Botucatu e condicionados ao Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, com ciclo claro-escuro de 12 h (7:00 h - 19:00 h) e temperatura controlada (23 ± 2 °C). Com exceção das fêmeas em restrição alimentar, os animais tiveram livre acesso à ração e também à água filtrada.

Como a ninhada é considerada a unidade experimental, irmãos não foram usados dentro de um mesmo grupo.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal do IB-UNESP-Botucatu, e estavam de acordo com os *Princípios Éticos na Experimentação Animal* adotado pelo *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*.

ACASALAMENTO

Para o acasalamento, foi colocado um macho dentro de cada gaiola contendo duas fêmeas, ao final da tarde. Diariamente foi feito o esfregaço vaginal, e quando observada a presença de espermatozoides e a fase estro do ciclo estral, foi nomeado o dia zero de prenhez. Neste dia, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais e aleatoriamente separadas em 02 grupos: controle, não submetidas à restrição alimentar, e submetidas à restrição alimentar durante a prenhez.

RESTRIÇÃO ALIMENTAR

Ratas do grupo controle receberam ração comercial padrão e água *ad libitum*, enquanto ratas do grupo restrição receberam a mesma dieta a 50% do consumo do grupo controle, estabelecido em esquema de “pair feeding”. Brevemente, as ratas prenhes receberam cada dia 50% da quantidade diária de ração ingerida pelas ratas do grupo controle durante toda a prenhez.

Após o nascimento, mães e filhotes de ambos os grupos receberam ração e água *ad libitum*. De modo a prevenir qualquer variação no crescimento dos neonatos devido à disponibilidade de leite durante a amamentação, o tamanho da ninhada ao nascimento foi padronizado em oito filhotes e manteve-se o maior número possível de filhotes machos. Filhotes fêmeas foram mantidas somente para se completar a ninhada, e ninhadas com número de filhotes inferior a oito foram descartadas.

A partir do desmame (22º dia de vida pós-natal), os filhotes machos foram separados em 04 grupos: controle, desnutrição *in utero*, estresse, e associação das duas últimas condições.

EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE

O estresse consistiu na contenção em tubo metálico, individualmente adaptado para determinar a restrição de todos os movimentos, mas permitindo a respiração do animal. A exposição ao estresse ocorreu em seções de contenção únicas diárias por 1 hora, 5 dias por semana, durante 2 semanas, entre 9:00 e 10:00 horas, à temperatura ambiente de 25°C. Durante a sessão de estresse, os grupos controle e desnutrido *in utero* permaneceram em suas gaiolas à temperatura ambiente de 25 °C, sem receber ração ou água. Ao término da sessão, os

animais dos grupos estresse e associação voltaram para suas respectivas caixas. Após 48 h da última sessão de estresse, os animais seguiram para os protocolos experimentais.

PROCEDIMENTOS PÓS-NATAIS E EVOLUÇÃO DO PESO CORPÓREO

O peso das mães foi aferido semanalmente, do dia zero de prenhez, até o dia do nascimento.

Cada ninhada foi pesada ao nascimento e cada filhote foi pesado semanalmente até a realização do protocolo de avaliação do comportamento. Foi verificado o número total de filhotes machos e fêmeas, por ninhada.

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO

TESTE DO CAMPO ABERTO

A atividade geral dos animais foi avaliada, durante 05 minutos, por meio da observação direta no campo aberto e consistiu na mensuração de comportamentos eliciados num espaço aberto e desconhecido, do qual o animal não pudesse escapar, construído conforme especificações modificadas por Broadhurst, 1960.¹² O campo aberto consiste de uma arena circular de madeira, sendo o chão dividido por meio de três círculos concêntricos (centro, meio e borda) e segmentos de reta, em dezenove partes semelhantes. A arena dista 48 cm do chão e tem uma cortina, na sua parte frontal, que permite ao observador a visão geral do animal e dificulta, a este, a visão do experimentador. Na parte superior, e distando 74 cm da arena, há 4 lâmpadas vermelhas de 40 W.

Os animais exibem uma tendência de se movimentar, mesmo na ausência de estímulos. A observação inicia-se ao colocar o animal no centro do aparelho, voltado para uma posição fixa escolhida.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

Locomoção (exploração): número de vezes em que o animal invade, com as quatro patas, um dos campos da arena;

Levantar (exploração aérea): número de vezes em que o animal se apóia nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto;

Limpeza: tempo, em segundos, de execução de movimentos com as patas anteriores em direção à boca ou à cabeça, podendo haver continuidade destes em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimento de lambar dirigido principalmente às porções laterais do corpo e à região genital;

Parada ou congelamento: tempo, em segundos, em que o animal permanece em imobilidade tônica, geralmente com o ventre rente ao chão, os olhos bem abertos e com respiração irregular.

TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado é um modelo experimental para mensuração de ansiedade em roedores¹³ e fundamenta-se na aversão que o animal tem por espaços abertos e, conseqüentemente, pelos braços abertos do aparelho.

Coloca-se o animal no centro do labirinto, denominado de espaço morto, com a cabeça voltada para o espaço aberto, sendo-lhe permitido explorar livremente o aparelho por 05 minutos. Durante este período foram registrados os números de entradas, bem como, o tempo de permanência nos braços abertos (NA, TA) e nos braços fechados (NF, TF).

O índice de ansiedade, isto é, a razão entre o número de entradas ou tempo de permanência nos braços abertos e o número total de entradas ou tempo nos braços abertos e fechados foi calculado ($NA/[NA+NF]$ e $TA/[TA+TF]$). Estes índices são diretamente proporcionais ao efeito ansiolítico. Assim, uma diminuição destes índices implica no aumento do comportamento ansiogênico.

As avaliações comportamentais foram realizadas ao final do ciclo claro, entre 16:00 e 18:00 h.

Ao final de cada sessão, os aparelhos foram limpos com álcool etílico 5%, v/v, para evitar possíveis trilhas deixadas pelos animais predecessores. Cada animal foi avaliado apenas uma única vez em cada aparelho.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O comportamento geral foi comparado pela análise de variância multifatorial, seguida do teste *a posteriori* de Tukey (SIGMASTAT 3.2). Os fatores na análise foram o estresse e a desnutrição *in utero*. Peso corpóreo, peso da ninhada e número de filhotes foram avaliados pelo teste *t* de Student (GRAPHPAD INSTAT 3.01). Quando pertinente, as variáveis foram previamente transformadas em *log* para a aplicação de teste paramétrico. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM) ou desvio padrão (SD). Em todos os experimentos, $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS

A evolução semanal do peso materno do dia zero de prenhez até o nascimento dos filhotes está apresentada na Tabela 1. O peso corpóreo materno aumentou em função da idade. Ainda, a restrição alimentar reduziu significativamente a evolução do peso materno a partir da 2ª semana de prenhez.

A restrição alimentar durante a prenhez não afetou o número total de filhotes e o número de filhotes

Tabela 1. Valores médios do peso materno durante a prenhez.

Parâmetro		Controle (n = 17)	Restrição Alimentar (n = 11)	Nível de Significância
	1ª semana de prenhez	262,16 \pm 15,34	285,12 \pm 10,03	NS
Peso Materno	2ª semana de prenhez	285,71 \pm 9,87	261,77 \pm 9,95	p < 0,05
	3ª semana de prenhez	309,72 \pm 11,48	259,85 \pm 11,15	p < 0,05
	4ª semana de prenhez	364,75 \pm 21,18	281,09 \pm 14,12	p < 0,05

Restrição alimentar = ratas que receberam, em esquema de "pair feeding", 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle, a partir da confirmação de prenhez. $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. NS: não significativo. Os valores representam a média \pm EPM. (n) = número de animais. Teste *t* de Student, $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

machos e fêmeas por ninhada. Semelhantemente, o peso da ninhada não foi alterado pela restrição alimentar materna (Tabela 2).

Semelhantemente ao observado ao nascimento, a desnutrição *in utero* não afetou a evolução do peso dos filhotes machos e fêmeas (machos – controle: $7,85 \pm 0,41$ g, $20,43 \pm 1,63$ g, $37,00 \pm 2,94$ g, $57,46 \pm 4,69$ g e desnutrido *in utero*: $5,88 \pm 0,35$ g, $18,58 \pm 1,25$ g, $38,23 \pm 1,93$ g, $53,27 \pm 2,32$ g, respectivamente para a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a semana e fêmeas – controle: $7,66 \pm 0,40$ g, $18,93 \pm 1,81$ g, $32,28 \pm 2,67$ g, $52,84 \pm 4,94$ g e desnutrida *in utero*: $5,83 \pm 0,48$ g, $18,92 \pm 1,93$ g, $36,10 \pm 3,27$ g, $52,14 \pm 4,82$ g, respectivamente para a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a semana; número de animais por grupo = 11-17; teste *t* Student, $p > 0,05$).

RESPOSTA COMPORTAMENTAL

CAMPO ABERTO

A exposição pós-natal crônica ao estresse de contenção não determinou qualquer alteração significativa na atividade geral em Campo Aberto, expressa pelos parâmetros locomoção, levantar,

limpeza e congelamento (Tabelas 3 e 4). Resultado semelhante foi observado em ratos submetidos à desnutrição *in utero* para todos os parâmetros comportamentais avaliados, exceto a locomoção na zona central e mediana do aparelho, que se mostrou reduzida em proles de ratas submetidas à restrição alimentar durante a prenhez (Tabelas 3 e 4). Ainda, a associação de ambos protocolos não alterou de modo significativo a atividade geral em Campo Aberto (Tabelas 3 e 4).

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A exposição pós-natal crônica ao estresse de contenção, isoladamente e em associação à desnutrição *in utero*, não determinou qualquer alteração significativa na atividade do animal no Labirinto em Cruz Elevado (Tabela 5). Entretanto, o tempo de permanência, mas não o número de entradas nos braços abertos, mostrou-se reduzido em proles de ratas submetidas à restrição alimentar durante a prenhez em relação ao grupo controle (Tabela 5). Por sua vez, o tempo de permanência, mas não o número de entradas nos braços fechados, mostrou-se aumentado em proles de

Tabela 2. Valores médios do número de filhotes por ninhada e peso da ninhada proveniente de ratas dos grupos controle e submetido à restrição alimentar.

Parâmetro		Controle (n = 17)	Restrição Alimentar (n = 11)	Nível de Significância
	Total	$7,66 \pm 0,67$	$6,71 \pm 1,23$	NS
Número de filhotes por ninhada	Machos	$4,66 \pm 0,53$	$4,00 \pm 0,44$	NS
	Fêmeas	$3,86 \pm 0,51$	$4,75 \pm 0,48$	NS
Peso da ninhada (g)		$53,76 \pm 4,13$	$41,54 \pm 3,67$	NS

Restrição alimentar = ratas que receberam, em esquema de “pair feeding”, 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle, a partir da confirmação de prenhez. Os valores representam a média \pm EPM. (n) = número de ninhadas. NS = não significativo. Teste *t* de Student, $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

Tabela 3. Locomoção em Campo Aberto de filhotes machos com 35 dias de idade, submetidos ou não à desnutrição *in utero* e ao estresse pós-natal crônico de contenção, isoladamente e em associação.

Grupos	Locomoção			
	Centro (nº de vezes)	Meio (nº de vezes)	Borda (nº de vezes)	Total (nº de vezes)
Controle (n = 17)	$10,35 \pm 8,51$ A	$21,53 \pm 8,80$ A	$61,06 \pm 23,22$ A	$92,94 \pm 27,54$ A
Estresse (n = 12)	$12,33 \pm 5,63$ A	$23,58 \pm 7,84$ A	$67,33 \pm 20,43$ A	$103,25 \pm 23,37$ A
Desnutrição <i>in utero</i> (n = 11)	$4,36 \pm 2,73$ B	$15,63 \pm 6,09$ B	$73,27 \pm 10,30$ A	$93,27 \pm 14,57$ A
Associação (n = 13)	$10,85 \pm 5,87$ A	$23,00 \pm 5,10$ A	$74,15 \pm 14,83$ A	$108,00 \pm 17,66$ A

Os valores representam a média \pm SD. Estresse = seções únicas de contenção 1 h/dia, 5 dias/semana, durante 2 semanas. Desnutrição *in utero* = proles de ratas que receberam, em esquema de “pair feeding”, 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle, a partir da confirmação de prenhez. Associação = ambos protocolos em associação. (n) = número de animais. Dentro de cada parâmetro, grupos que não compartilham uma letra são estatisticamente diferentes. MANOVA/Tukey, $p < 0,05$.

ratas submetidas à restrição alimentar durante a prenhez em relação ao grupo controle (Tabela 5). Ainda, o índice de ansiedade, tanto expresso pelo tempo de permanência em % quanto pelo número de entradas em % foi diminuído pela desnutrição *in utero* (Tabela 5).

DISCUSSÃO

A possibilidade de que o estresse pós-natal pode modificar as respostas comportamentais adaptativas induzidas pela desnutrição *in utero* não foi ainda suficientemente investigada. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos do estresse crônico pós-natal sobre a resposta comportamental adaptativa de ratos machos jovens à desnutrição *in utero*.

Ainda que a restrição alimentar durante a prenhez tenha resultado em redução significativa do peso corpóreo materno, a partir da 2ª semana de prenhez, o peso corpóreo da prole ao nascimento não foi

comprometido. Todos os animais mostraram-se saudáveis à semelhança do observado por Nasuti et al. (2007)¹⁴. Além disso, o presente estudo corrobora observações de Franco et al. (2007)¹⁵ mostrando não haver qualquer alteração no número de filhotes por ninhada proveniente de ratas desnutridas durante a prenhez. Independentemente do protocolo, desnutrição *in utero* e/ou exposição crônica ao estresse, as condições gerais dos filhotes mantiveram-se dentro da normalidade, de modo que as alterações de atividade observadas nos aparelhos de avaliação comportamental devem ser atribuídas a alterações neurofisiológicas durante o desenvolvimento.

No Campo Aberto, utilizado para medir o comportamento exploratório e de estereotipia da prole, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais para os parâmetros avaliados, exceto para a locomoção no centro e meio do aparelho no grupo de animais submetidos

Tabela 4. Atividade geral em Campo Aberto de filhotes machos com 35 dias de idade, submetidos ou não à desnutrição *in utero* e ao estresse pós-natal crônico de contenção, isoladamente e em associação.

Grupos	Parâmetros		
	Levantar (nº de vezes)	Limpeza (segundos)	Congelamento (segundos)
Controle (n = 17)	92,94 ± 27,54	30,71 ± 13,74	9,65 ± 6,83
Estresse (n = 12)	103,25 ± 23,37	37,16 ± 16,44	9,50 ± 9,95
Desnutrição <i>in utero</i> (n = 11)	98,09 ± 18,94	24,27 ± 10,91	12,45 ± 11,03
Associação (n = 13)	108,77 ± 19,18	37,54 ± 12,29	15,92 ± 12,20

Os valores representam a média ± SD. Estresse = seções únicas de contenção 1 h/dia, 5 dias/semana, durante 2 semanas. Desnutrição *in utero* = proles de ratas que receberam, em esquema de "pair feeding", 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle, a partir da confirmação de prenhez. Associação = ambos protocolos em associação. (n) = número de animais. MANOVA/Tukey, p > 0,05.

Tabela 5. Atividade, no Labirinto em Cruz Elevado, de filhotes machos com 35 dias de idade, submetidos ou não à desnutrição *in utero* e ao estresse pós-natal crônico de contenção, isoladamente e em associação.

Parâmetros	Grupos			
	Controle (n = 17)	Estresse (n = 12)	Desnutrição <i>in utero</i> (n = 11)	Associação (n = 13)
NA	9,05 ± 4,52 AB	11,58 ± 3,89 A	6,27 ± 3,52 B	10,00 ± 3,27 A
NF	6,88 ± 2,98 A	8,17 ± 1,70 A	7,27 ± 3,80 A	9,77 ± 2,59 A
TA (s)	135,18 ± 53,48 A	122,25 ± 46,12 A	62,36 ± 48,47 B	120,15 ± 43,94 A
TF (s)	123,18 ± 13,99 A	131,92 ± 44,24 A	198,18 ± 58,61 B	119,92 ± 43,32 A
TA (%)	52,68 ± 21,11 A	47,70 ± 16,67 A	24,46 ± 19,81 B	49,99 ± 17,02 A
NA (%)	55,50 ± 1,30 A	57,76 ± 6,13 A	44,44 ± 8,66 B	50,08 ± 7,78 A

Os valores representam a média ± SD. Estresse = seções únicas de contenção 1 h/dia, 5 dias/semana, durante 2 semanas. Desnutrição *in utero* = proles de ratas que receberam, em esquema de "pair feeding", 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle, a partir da confirmação de prenhez. Associação = ambos protocolos em associação. NA = número de entradas nos braços abertos. NF = número de entradas nos braços fechados. TA = tempo nos braços abertos. TF = tempo nos braços fechados. TA (%) = porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, isto é, TA/[TA+TF] x 100. NA (%) = porcentagem do número de entradas nos braços abertos, isto é, NA/[NA+NF] x 100. Dentro de cada parâmetro, grupos que não compartilham uma letra são estatisticamente diferentes. (n) = número de animais. MANOVA/Tukey, p < 0,05.

à desnutrição *in utero*, que se mostrou reduzida em relação aos demais grupos. Tal diminuição sugere um comprometimento da atividade exploratória do animal desnutrido *in utero*. Uma vez que a redução de locomoção ocorreu principalmente no centro e meio do aparelho e não em sua borda, pode-se inferir ainda um aumento de ansiedade nos animais deste grupo. Resultados semelhantes foram observados em proles de ratas submetidas à restrição protéica durante a prenhez.^{16,17}

O aumento de ansiedade em prole de ratas submetidas à restrição alimentar durante a prenhez foi confirmado no Labirinto em Cruz Elevado, onde se observou diminuição do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos, aumento do tempo de permanência nos braços fechados e diminuição dos índices de ansiedade. Tal aumento na avaliação de risco e aversão aos braços abertos é indicativo de condição ansiogênica. Entretanto, as vias neuroquímicas envolvidas neste fenômeno permanecem por ser esclarecidas.

A literatura tem mostrado que em indivíduos vulneráveis, a exposição ao estresse pode resultar em alterações comportamentais, tais como transtorno de ansiedade generalizada, transtorno depressivo maior, entre outros.¹⁸ Alterações neurocomportamentais semelhantes foram também descritas em animais. Assim, Conrad et al. (2011)⁹ observaram aumento de ansiedade em camundongos submetidos ao estresse social crônico de 6 a 8 semanas. Entretanto, no presente estudo, a exposição pós-natal crônica ao estresse de contenção, isoladamente, não determinou qualquer alteração comportamental em ratos jovens. Mais do que isso, não representou

fator de risco comportamental adicional quando associado à desnutrição *in utero*, uma vez que suprimiu o comportamento ansiogênico pós-natal induzido por esta condição. A ausência de alterações comportamentais induzidas pela exposição pós-natal crônica ao estresse de contenção, bem como a ausência de risco adicional à desnutrição *in utero*, poderiam ser justificadas uma vez que a resposta comportamental adaptativa ao estresse está na dependência do nível de estresse (alta ou baixa intensidade), do tipo de estresse (social, contenção), da frequência de exposição ao estresse (agudo vs crônico), da fase de desenvolvimento do animal, entre outros.¹⁸

CONCLUSÃO

A ausência de alterações comportamentais em ratos jovens expostos à desnutrição *in utero* em associação ao estresse pós-natal crônico sugere que as alterações fisiológicas induzidas pela desnutrição *in utero* que determinam a condição ansiogênica na prole ocorrem principalmente durante o desenvolvimento pós-natal, uma vez que a exposição subsequente ao estresse pós-natal impediu a expressão destas alterações. Finalmente, os achados do presente estudo podem contribuir para o conjunto de evidências que conduzam à prevenção e/ou a benefícios terapêuticos contra as alterações neurocomportamentais na vida pós-natal induzidas pela desnutrição *in utero*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo suporte financeiro através da Bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

1. Cole MA, Kalman BA, Pace TWW, Topczewski F, Lowrey MJ, Spencer RL. Selective blockade of the mineralocorticoid receptor impairs hypothalamic-pituitary-adrenal axis expression of habituation. *J Neuroendocrinol.* 2000;12(10):1034-42. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00555.x>. PMID:11012846.
2. Maslov LN, Naryzhnaia NV, Krylatov AV, Gross GJ. [Endogenic opioid peptides and antiarrhythmic effect of adaptation to stress]. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2004;4(4):11-4. PMID:15568495.
3. Carter RN, Pinnock SB, Herbert J. Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress? *Neuroscience.* 2004;126(1):9-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.018>. PMID:15145069.
4. Zhang Y, Li N, Yang Z. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicol Lett.* 2010;193(2):167-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.01.002>. PMID:20079408.
5. Agrawal A, Jaggi AS, Singh N. Pharmacological investigations on adaptation in rats subjected to cold water immersion stress. *Physiol Behav.* 2011;103(3-4):321-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.014>. PMID:21324329.
6. Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM, Herman JP. Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and

- sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*. 2003;144(12):5249-58. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-0713>. PMID:12960031.
7. Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav*. 1988;43(1):41-6. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90096-0](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(88)90096-0). PMID:3413249.
 8. De Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, Van der Gugten J. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav*. 1990;47(6):1117-24. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90361-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(90)90361-7). PMID:2395915.
 9. Conrad KL, Louderback KM, Gessner CP, Winder DG. Stress-induced alterations in anxiety-like behavior and adaptations in plasticity in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav*. 2011;104(2):248-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.001>. PMID:21396387.
 10. Wang Q, Yu K, Wang J, Lin H, Wu Y, Wang W. Predator stress-induced persistent emotional arousal is associated with alterations of plasma corticosterone and hippocampal steroid receptors in rat. *Behav Brain Res*. 2012;230(1):167-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.051>. PMID:22327185.
 11. Benton D. Neurodevelopment and neurodegeneration: are there critical stages for nutritional intervention? *Nutr Rev*. 2010;68(Suppl 1):S6-10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00324.x>. PMID:20946370.
 12. Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk HJ. *Experiments in personality*. London: Rutledge and Kegan Paul Press; 1960. p. 31-61.
 13. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986;24(3):525-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6). PMID:2871560.
 14. Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni ML, Di Stefano A, Sozio P, Cantalamessa F. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology*. 2007;229(3):194-205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2006.10.015>. PMID:17140720.
 15. Franco MCP, Akamine EH, Rebouças N, Carvalho MHC, Tostes RCA, Nigro D, et al. Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: implications of oxidative stress. *Life Sci*. 2007;80(8):709-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.10.028>. PMID:17157880.
 16. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Charco R, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci*. 2012a;30(1):39-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.10.002>. PMID:22023958.
 17. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Rodríguez-González GL, Chavira R, Bautista CJ, McDonald TJ, et al. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res*. 2012b;227(2):324-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.008>. PMID:21704656.
 18. Margis R, Picon P, Cosner AF, Silveira RO. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *R Psiquiatr RS*. 2003;25(1):65-74.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Souza AP: Graduanda em Nutrição, UNESP.

Vieira JSP: Mestre em Farmacologia, UNESP.

Cordellini S: Doutorado em Ciências (Farmacologia), USP.

Local de realização: Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Fonte de financiamento: Bolsa de Iniciação Científica - FAPESP processo número: 2012/13945-0.

Declaração de conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa: Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal do IB-UNESP-Botucatu, e estavam de acordo com os *Princípios Éticos na Experimentação Animal* adotado pelo *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (protocolo nº 443-CEUA).

Recebido: Set. 16, 2014
Aprovado: Jun. 24, 2015