

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

NEUROCIÊNCIAS

**INTERAÇÕES ENTRE EXPOSIÇÃO A TRAUMA NO INÍCIO DA VIDA E
DEFICIÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS N-3 EM
MARCADORES BIOLÓGICOS DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS**

TESE DE DOUTORADO

CHARLES FRANCISCO FERREIRA

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

NEUROCIÊNCIAS

**INTERAÇÕES ENTRE EXPOSIÇÃO A TRAUMA NO INÍCIO DA VIDA E
DEFICIÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS N-3 EM
MARCADORES BIOLÓGICOS DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito obrigatório para a obtenção do
Grau de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Dr^a. Carla Dalmaz

Co-Orientadora: Dr^a. Patrícia Pelufo Silveira

PORTO ALEGRE

2015

Dedico este trabalho aos meus pais - Maria Fermino e Benedito Fermino, in memoriam - e demais familiares, por todo amor, confiança e por transporem distâncias, sempre fornecendo apoio incondicional.

*Eu fiz um acordo pacífico de coexistência com o tempo:
nem ele me persegue, nem eu fujo dele. Qualquer dia a
gente se encontra e, dessa forma, vou vivendo
intensamente cada momento...*

Adaptado de Mário Lago

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus anjos protetores por estarem comigo em todos os momentos de minha vida, me orientando - por pensamentos e incentivos de coragem quando a distância e o tempo não nos permitiam estar juntos. Vocês - Maria Cléto Rafael Fermino, Benedito Fermino (*in memoriam*), Angela Maria Fermino, Maria das Graças Fermino, Carmem Firmino Scandalo, Antonieta Fermino Lourenção, Paulo Firmino do Carmo, Pedro José Fermino, João Fermino Rafael, César Rafael Fermino e Marcos Rafael Fermino - são os “reais” e “grandes” responsáveis por eu chegar até aqui! Obrigado por todo amor, carinho e apoio nos momentos que julguei mais difíceis. Este trabalho é por todos nós! Se hoje sou o que sou, sou graças a vocês - os meus primeiros e eternos mestres, exemplos de vida.

Também dedico este trabalho para todos os meus familiares - sobrinhos, sobrinhas, tios, tias, cunhados e cunhadas - por toda ajuda que me forneceram durante mais esta etapa de minha vida.

Às minhas queridas orientadoras, Dra. Carla Dalmaz e Dra. Patrícia Pelufo Silveira, a quem devo grande parte da minha formação enquanto pesquisador. Por terem me fornecido votos de confiança, me acolhendo em seus respectivos grupos de pesquisa, confiando e acreditando em meu trabalho, além de me proporcionarem ótimas oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Agradeço por toda sensibilidade, pelo carinho, pela orientação, pelo apoio e por tantos ensinamentos, por estarem sempre dispostas a esclarecer dúvidas e a sugerir soluções, além de toda atenção fornecida. Também agradeço pela perspicácia nas discussões de aspectos relevantes tanto no planejamento quanto na execução deste trabalho, pelos exemplos de profissionais

conscientes nos quais me espelho, pelo companheirismo em todas as horas e pela convivência agradável ao longo deste período de doutoramento.

À Dra. Juliana Rombaldi Bernardi - “JukaBer” ou “JuJuBa” - por todos os momentos que compartilhamos juntos, dos piores aos melhores, pelas técnicas que nunca davam certas e até mesmo por todas as comemorações e publicações da “dupla dinâmica”. Por toda a ajuda nos experimentos, pela amizade, pelo respeito, pela disponibilidade, pela paciência e por toda compreensão. Por me fazer crescer e amadurecer, mesmo quando eu não demonstrava concordar com os seus conselhos! Por ser um grande exemplo de competência e de profissionalismo, além de ser uma grande amiga, com a qual tive muito prazer em trabalhar em parceria ao longo destes últimos cinco anos. Este trabalho também é seu JuJuBa! Espero ter a honra de trabalhar mais vezes contigo no futuro, agora versão “Super Gêmeos Doutores Ativar”!

Às MSc. Emily De Conto - “ICzinha” - e MSc. Moara Mingori - “Moah” - pela amizade e paciência desde os áureos tempos. Por todo apoio indispensável para a realização destes trabalhos, sempre dispostas e presentes. Digo às “irmãs metralha da Biologia Molecular” um muito obrigado pela paciência e pela disposição em ajudar, pela amizade e até mesmo pelos cafezinhos no Toldo Vermelho!

A MSc. Caroline Ayres, pela oportunidade de colaborar em seus trabalhos, pela amizade e por toda atenção disponibilizada. Pelas conversas, pelos conselhos e por nunca deixar de acreditar em um mundo melhor! Obrigado por me permitir fazer parte de sua trajetória!

Aos colegas de Laboratório Diego Carrilho - “Dih” -, MSc. Natividade Pereira - “Nati” - MSc. Danusa Arcego, MSc. Carine Lampert, MSc. Ana Toniazzi e Dra. Rachel Krolow - “Rachs” - pela ajuda nos experimentos, especialmente nos

relacionados ao comportamento maternal e testes bioquímicos (BDNF, dissecações de áreas cerebrais, estresse oxidativo e padrões mitocondriais), com os quais nos estressamos e nos divertimos, pelos tratamentos dos animais em muitos finais de semanas e pelos bons momentos vividos.

Aos meus estimados amigos Anderson Nunes - “Andy” - Paula Brabo, Andrea Ventura, Suelen Homrich Motta, Wenderson Norberto e Paula Silveira, pela amizade verdadeira, pelas risadas, pela convivência, pela atenção, pelos “chimarrões” e “lagarteadas”, pelas conversas, pelos conselhos, por toda preocupação, pelos bons momentos, pelos cafés e também pelas “N.F.s”.

À minha querida amiga Liziane Ferreira Vaqueiro, também conhecida como “Lizi”. Obrigado por ser minha mãe adotiva gaúcha, por todo cuidado e zelo que tens por mim e pelos meus pequenos bichanos “Nina” e “Dom”. Agradeço pela amizade, pelas conversas e conselhos, por se preocupar comigo e por todos os nossos “bons momentos” juntos!

Às MSc. Thais Castro, MSc. Zuleika Costa e Dra. Isabel Amaral Martins, pelos votos de confiança, pela acolhida, pela amizade, pelos ensinamentos e por me permitirem crescer pessoalmente e profissionalmente.

Aos meus colegas Professores da Faculdade Cenecista de Osório (CNEC/FACOS), em especial: Dra. Karine Demoliner, MSc. Fernando Lemos, MSc. Cristina Wesner, MSc. Lisandra Carrilho, MSc. Sérgio Ferreira, MSc. Mariusa Warpechowski, MSc. Beatriz Kauri, MSc. Ângela Freitas, MSc. Leandro Alencastro, MSc. Angela Kunzler, MSc. Dioneia Mendes, MSc. Renata Zanella, Dr. Edison Saturnino, MSc. Lisiane Zavalhia, MSc. Marcelo Ribeiro, MSc. Igor Velho, Dra. Ana

Ribeiro, MSc. Isabel Brandão, Dra. Vera Machado e Dr. Rodrigo Lages, pela convivência e por todo exemplo.

Aos meus queridos alunos dos Cursos de Graduação em Ciências Biológicas: Licenciatura, Biomedicina: Bacharelado, Enfermagem: Bacharelado, Educação Física: Bacharelado, Psicologia: Bacharelado e Fisioterapia: Bacharelado da Faculdade Cenecista de Osório (CNEC/FACOS). Também dedico este trabalho aos alunos dos Cursos de Pós-Graduação *lato sensu* em Psicopedagogia e Neuropsicopedagogia, além de todos os alunos que já tive a oportunidade de “fazer parte” de suas trajetórias. Em especial, aos meus queridos orientandos, também designados “Gurizada”. Para vocês, espero ser uma parcela significativa do que os meus grandes mestres foram para mim! Contem comigo sempre que necessário!

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia do Estresse (Laboratório 37, Departamento de Bioquímica, UFRGS), por toda amizade e tolerância, pelo apoio técnico e pela experiência compartilhada, otimizando o trabalho e tornando-o menos árduo. Peço desculpas por sempre agir como um “trovão” em nosso laboratório, mas acreditem, levarei de cada um de vocês excelentes referenciais e qualidades. Dra. Cristie Noschang, Dra. Grasielle Kincheski, Dra. Letícia Pettenuzzo, Dra. Luisa Diehl, Dra. Rachel Krolow, MSc. André Benitz, MSc. Ana Toniazzo, MSc. Carina Mota, MSc. Carine Lampert, MSc. Camilla Lazzaretti, MSc. Danusa Arcego, MSc. Eduardo Toigo, MSc. Márcia Kratz, MSc. Marina Marcolin, MSc. Natividade Pereira, Ana Paula Huffell, Diego Bertolini e Diego Carrilho.

Também dedico este trabalho aos colegas do Laboratório 35 (Departamento de Bioquímica, UFRGS), do Laboratório de Pediatria Translacional (LPT, HCPA), do Núcleo de Estudos em Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA, HCPA) e do

Laboratório de Psiquiatria Molecular (LPM, HCPA) pela convivência, pelas colaborações e auxílios, além dos bons momentos vivenciados.

Ao Dr. Marcelo Zubaran Goldani, por toda colaboração e pelo espaço cedido para a realização de experimentos desta tese de doutorado. Também agradeço pelos conselhos e ensinamentos fornecidos, pela disposição e auxílio sempre que solicitado, bem como pela acolhida em seu grupo de pesquisa ao longo da realização destes experimentos (NESCA, HCPA).

Às Dra. Gisele Gus Manfro, Dra. Vera Lúcia Bosa, Dra. Letícia Ferreira Pettenuzzo, e aos Dr. Flávio Kapczinski e Dr. Giovanni Salum, pela possibilidade de colaborações, bem como pelos múltiplos ensinamentos, possibilitando a realização parcial de resultados apresentados nesta tese de doutorado.

Aos Professores componentes da banca examinadora, por toda cordialidade e pela avaliação deste trabalho.

Aos Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências (ICBS, UFRGS), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica (Departamento de Bioquímica, UFRGS) e do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (Pediatria, HCPA, UFRGS) por toda contribuição e conhecimento disponibilizado para a minha formação e aprendizado, bem como pela cortesia, profissionalismo e dedicação de sempre.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal (UEA) - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - e aos funcionários do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) - Departamento de Bioquímica - por todo cuidado e zelo com os animais, além de toda atenção disponibilizada.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa de doutorado fornecida.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, pela oportunidade de realizar este doutorado.

A todos que, cientes ou não, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

PARTE I.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS	16
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DA DOENÇA	20
1.2. NEUROFISIOLOGIA DO ESTRESSE	22
1.3. ESTRESSE E MODELOS ANIMAIS	26
1.4. ESTRESSE E RELEVÂNCIA CLÍNICA	29
1.5. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS	31
1.6. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E RELEVÂNCIA CLÍNICA	35
1.7. MITOCÔNDRIAS E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVO GERAL.....	42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
PARTE II.....	44
1. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	45
1.1. <i>CAPÍTULO 1</i>	47
1.2. <i>CAPÍTULO 2</i>	57
1.3. <i>CAPÍTULO 3</i>	70
PARTE III.....	76
1. DISCUSSÃO.....	77
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
3. CONCLUSÕES.....	97

4. PERSPECTIVAS	99
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
PARTE IV	156
1. ANEXOS.....	157
1.1. CARTAS DE APROVAÇÕES: COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA	158
1.2. DEMAIS PUBLICAÇÕES AO LONGO DO DOUTORADO: 2010 -2015	164

PARTE I

RESUMO

FERREIRA, C.F. **INTERAÇÕES ENTRE EXPOSIÇÃO A TRAUMA NO INÍCIO DA VIDA E DEFICIÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS N-3 EM MARCADORES BIOLÓGICOS DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS**. 2015. 175 F. TESE (DOUTORADO) – PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE (ICBS) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS). PORTO ALEGRE. 2015.

As exposições precoces às diferentes intervenções, como dietas e estresse, estão associadas a persistentes alterações sobre aspectos neuroquímicos e comportamentais, podendo este ser considerado um gatilho de transtornos psiquiátricos na vida adulta. O presente trabalho objetivou determinar se estas intervenções neonatais poderiam interagir com uma dieta deficiente em ácidos graxos poliinsaturados n-3 (n-3 PUFA), aplicados durante o desenvolvimento, com foco nos níveis centrais (hipocampo) e séricos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), bem como sobre a atividade enzimática e aspectos morfológicos (e.g. massa, potencial) mitocondriais do hipocampo de ratos machos adultos. Em nossa abordagem experimental animal, as ninhadas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos intactos, manipulados neonatalmente [MN, separação mãe-filhote durante 10min/dia, entre o 1º e o 10º dia pós-natal (DPN)] e separado materno [SM, separação mãe-filhote durante 3h/dia, entre o 1º e o 10º DPN]. No DPN 35, os filhotes machos foram agrupados em dieta n-3 PUFA adequada ou deficiente, por 17 semanas de tratamento. O peso e o consumo de ração foram aferidos semanalmente. Após este tratamento, soro e hipocampo foram coletados. Kits comerciais foram utilizados para a medição dos níveis hipocampais e séricos de BDNF (ELISA), bem como a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (método enzimático, análise espectrofotométrica), massa e potencial mitocondriais (MitoTracker, citometria de fluxo). A expressão gênica de BDNF no hipocampo também foi medida por RT-qPCR. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA de duas vias ou de medidas repetidas. Os níveis de significância foram fixados em $p < 0,05$. A dieta deficiente em n-3 PUFA, associada aos estressores neonatais deste estudo (MN, SM) foram capazes de alterar o peso corporal e a ingestão de alimentos de um modo específico, uma vez que os níveis mais elevados destes parâmetros foram encontrados em animais submetidos a SM. Animais submetidos a MN alimentados com uma dieta n-3 PUFA deficiente exibiram uma maior atividade exploratória em resposta a um psicoestimulante (dietilpropiona). Embora os níveis proteicos séricos e hipocampais de BDNF permanecessem inalterados pelos tratamentos aplicados, fomos capazes de demonstrar a redução de sua expressão gênica em animais alimentados com uma dieta n-3 PUFA deficiente. Considerando os padrões mitocondriais e parâmetros de estresse oxidativo, as atividades das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) se encontraram aumentadas no hipocampo de animais submetidos a uma deficiência crônica em n-3 PUFA. Esta deficiência mostrou interações com o fator estresse neonatal em alguns destes parâmetros (e.g. atividade da GPx, produção de EROs), indicando um possível sinergismo entre estressores neonatais e a deficiência em n-3 PUFA. Os níveis de tióis foram significativamente menores nos grupos estressados (MN, SM), sendo a dieta n-3 PUFA deficiente capaz de aumentar a quantidade de tiol no hipocampo. Por outro lado, animais estressados tratados cronicamente com uma dieta deficiente em n-3 PUFA apresentaram níveis mais elevados de tiol. Contudo, a MN *per se* foi capaz de diminuir o potencial mitocondrial hipocampal. Adicionalmente, um estudo com humanos teve como objetivo correlacionar os níveis de BDNF periféricos ao consumo de n-3 PUFA em adolescentes. Para este estudo, 137 adolescentes de uma amostra enriquecida para psicopatologias de ansiedade foram submetidos a um questionário de frequência alimentar (QFA), para uma análise quantitativa do consumo de macronutrientes e micronutrientes de n-3 PUFA. As correlações de Spearman foram realizadas para avaliar possíveis associações entre o consumo de n-3 PUFA e os níveis periféricos de BDNF. As amostras de sangue foram coletadas entre 7 a 10h após o período de 10-12h de jejum, sendo o soro armazenado para medir os níveis de BDNF. Todas as análises de BDNF foram realizadas no mesmo dia por ELISA, utilizando anticorpos monoclonais específicos para o BDNF, de acordo com as instruções do fabricante. Os efeitos de possíveis confundidores (e.g. consumo total de gordura, idade, sexo e medida de ansiedade) foram examinados por modelos de regressões lineares. Apesar de algumas limitações apresentadas (e.g. o tamanho reduzido da amostra, alta incidência de adolescentes ansiosos), o que poderia limitar a validade externa deste resultado, fomos capazes de detectar uma correlação entre o consumo de n-3 PUFA e os níveis séricos de BDNF em adolescentes. Como conclusão geral, esta tese demonstra que a manipulação neonatal e separação materna, associada com uma deficiência em n-3 PUFA, são capazes de alterar parâmetros comportamentais e neuroquímicos na idade adulta. Este sinergismo foi capaz de diminuir a expressão gênica de BDNF no hipocampo, embora não apresentando qualquer alteração deste parâmetro periféricamente. A correlação entre os níveis consumidos de n-3 PUFA, em uma população de adolescentes em idade escolar, com os níveis séricos de BDNF também foi encontrada. Ainda, as alterações nas atividades enzimáticas mitocondriais observadas no hipocampo destes animais reforçam a importância da participação desta estrutura, além de sua possível relação com o desenvolvimento de desordens psiquiátricas e de humor. Considerando-se a nossa abordagem metodológica em ratos, a mesma pode ser um protocolo útil para se estudarem as interações entre o ambiente precoce e a nutrição ao curso de vida em diferentes desfechos neuroquímicos.

PALAVRAS-CHAVE: estresse neonatal, manipulação neonatal, separação materna, ácidos graxos poliinsaturados n-3, n-3 PUFA, transtornos psiquiátricos.

ABSTRACT

FERREIRA, C.F. **INTERACTIONS BETWEEN EARLY LIFE TRAUMA EXPOSURE AND POLYUNSATURATED FATTY ACID N-3 DEFICIENCY IN BIOLOGICAL MARKERS OF PSYCHIATRIC DISORDERS.** 2015. 175 F. TESE (DOUTORADO) – PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE (ICBS) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS). PORTO ALEGRE. 2015.

Early exposure to different interventions, as diets and stress, are associated with persistent alterations in neurochemistry and behavior, and can be considered a trigger of psychiatric disorders in adulthood. This study investigated whether neonatal interventions interact with a diet deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) applied during development, focusing on central (hippocampus) and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF), as well as mitochondrial enzymatic activity and morphology (e.g. mass, potential) in adult male rats. In our animal study, litters were randomized into non-handled (NH), handled [H, mother-offspring separation for 10min/day from 1st-10th postnatal day (PND)] and separated (S, separation for 3h/day from the 1st-10th PND) groups. On PND 35, male pups were randomized into adequate or deficient diet in n-3 PUFA for 17 weeks. The weight and food intake were measured weekly. Serum and hippocampi were collected after this n-3 PUFA treatment. Commercial kits were used for measuring hippocampal and serum BDNF (ELISA), as well as mitochondrial chain respirator complexes (enzymatic method, spectrophotometric analysis), mitochondrial mass and potential (MitoTracker, flow cytometry). Hippocampal BDNF gene expression was also measured by RT-qPCR. Statistical tests used were Two-Way or repeated measures ANOVA. Significance levels were set at $p < 0.05$. A n-3 PUFA deficient diet, in association with neonatal stressors used in this study (H, MS) were able to alter body weight and food intake in a specific way, since higher levels of these parameters were found in animals subjected to MS. Animals subjected to H fed an n-3 PUFA deficient diet displayed enhanced exploratory activity in response to a psychostimulant (diethylpropion). Although serum protein levels and hippocampus BDNF remained unchanged by the treatments applied, we were able to demonstrate its gene expression reduction in the hippocampus of animals fed an n-3 PUFA deficient diet. Considering mitochondrial and oxidative stress parameters, the activities of antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) and the production of reactive oxygen species (ROS) were increased in the hippocampus of rats subjected to a deficiency n-3 PUFA. This deficiency displayed interactions with neonatal stress factor in some of these parameters (e.g. GPx activity, ROS), indicating a possible synergism between neonatal stressors and n-3 PUFA deficiency. Thiol levels were significantly decreased by neonatal stressors (H and MS), and the n-3 PUFA deficient diet was able to increase its total amount in hippocampus. On the other hand, chronically stressed animals treated with an n-3 PUFA deficient diet showed higher thiol levels. However, H per se was able to decrease mitochondrial potential in hippocampus. Additionally, a clinical study aimed to correlate peripheral BDNF levels and n-3 PUFA consumption in adolescents. For this study, 137 adolescents from a sample enriched for psychopathology of anxiety were subjected to a food frequency questionnaire (FFQ), in order for measuring the quantitative analysis of n-3 PUFA macronutrients and micronutrients consumption. Spearman correlations were performed to assess the association between n-3 PUFA consumption and serum BDNF levels. Blood samples were collected between 7 and 10h after fasting period of 10-12h, and serum was stored in order to measure BDNF levels. All BDNF measurements were performed in the same day by sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for BDNF, according to the manufacturer's instructions. Effects of potential confounders (e.g. total fat consumption, age, gender, anxiety) were examined using linear regression models. Although some limitations were presented (e.g. small sample size with high incidence of eager teenagers), which could limit the external validity of this result, we were able to detect a correlation between the consumption of n-3 PUFA and BDNF serum levels in adolescents. As a general conclusion, this thesis reports that neonatal handling and maternal separation, associated with a nutritional deficiency in n-3 PUFA, were able to change behavioral and neurochemical parameters in adulthood. This synergism was able to decrease BDNF gene expression in the hippocampus, while not presenting any change of this parameter peripherally. A correlation between the consumption levels of n-3 PUFA, in a population of schoolchildren with BDNF serum levels was also found. Still, changes in mitochondrial enzymatic activities observed in the hippocampus of these animals reinforce the importance of this structure participation and its relation to the development of psychiatric and mood disorders. Considering our rat methodological approach, it can be a useful tool for studying the interactions between early life environment and life-course nutrition on different neurochemical outcomes.

KEYWORDS: early stress, neonatal handling, maternal separation, n-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA, psychiatric disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AA – ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

ACTH – HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓPICO

AG – ÁCIDO GRAXO

ALA – ÁCIDO A-LINOLÊNICO

ATP – ADENOSINA TRIFOSFATADA

AVP – ARGININA-VASOPRESSINA

BDNF – FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO

BST – NÚCLEO DA ESTRIA TERMINAL

CAT – ENZIMA CATALASE

CRH – HORMÔNIO LIBERADOR DE CORTICOTROPINAS

DCFH - DICLOROFLUORESCÉINA

DHA – ÁCIDO DOCOSAEXAENOICO

DOHAD – ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA (DO INGLÊS,
DEVELOPMENTAL ORINGS OF HEALTH AND DISEASE)

DPN – DIA PÓS-NATAL

DSM IV – MANUAL DE DIAGNÓSTICO MÉDICO 4ª. EDIÇÃO

E.G. – POR EXEMPLO (DO LATIM, *EXEMPLI GRATI*)

EIXO HHA – EIXO HIPOTÁLAMO HIPÓFISE ADRENAL

EPA – ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO

ET AL. – E OUTROS (DO LATIM, *ET ALII - ET ALIAE – ET ALIA*)

GPX – ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE

GR – RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDES

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA

I.P. – INTRAPERITONEAL

LA – ÁCIDO LINOLEICO

LC – *LOCUS COERULEUS*

MN – MANIPULAÇÃO NEONATAL

MPFC – CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL

MR – RECEPTOR MINERALOCORTICÓIDE

N-3 PUFA – ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3

N-6 PUFA – ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-6

NA - NORADRENALINA

PUFA – ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

PVN – NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO

QFA – QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

EROS – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

SAM – SISTEMA SIMPÁTICO ADRENOMEDULAR

SCARED – ESCALA PSICOMÉTRICA DE ANSIEDADE (DO INGLÊS, *SCREEN FOR CHILD ANXIETY RELATED EMOTIONAL DISORDERS*)

SM – SEPARAÇÃO MATERNAL

SNC – SISTEMA NERVOSO CENTRAL

SNP – SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

SNS – SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

SOD – ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE

TAB – TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR

TRKB – RECEPTOR TIROSINA CINASE B

UCP – PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS DESACOPLADORAS (DO INGLÊS, *UNCOUPLING PROTEIN*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DA DOENÇA

Com base em estudos epidemiológicos de diferentes partes do mundo, relações das possíveis influências de determinados fatores ambientais durante períodos de vulnerabilidade (*e.g.* período embrionário, período neonatal, infância e adolescência) indicaram alterações permanentes na expressão genética e fenotípica dos indivíduos, resultando em padrões diferenciados de saúde ou de doença nos mesmos [1-6]. Nesta perspectiva, estudos pré-clínicos [7, 8] e clínicos [7, 9-14] apontam para a mesma direção, sugerindo que a exposição aos agravos ambientais estudados apresenta uma forte associação com o desenvolvimento de doenças crônicas ao longo da vida. Considerados em conjunto, estes achados possibilitam inferir que possíveis ajustes metabólicos possam influenciar o surgimento de alterações permanentes ao longo do desenvolvimento [6].

A partir deste direcionamento, Barker *et al.* formularam a hipótese de que condições adversas ao ambiente intrauterino ou durante o período de infância estariam relacionadas ao aumento de risco para o estabelecimento de doenças cardiovasculares ao longo da vida [15]. Este estudo, somado a estudos posteriores, se tornaram as comprovações científicas da existência de uma relação causal direta entre eventos perinatais adversos com impacto sobre a saúde dos indivíduos, o que os modifica de maneira persistente até a vida adulta [16-24]. Com estes achados, a linha de investigação científica denominada “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença” – *DOHaD* (do inglês “*Developmental Origins of Health and Disease*”) foi formulada, agregando informações de múltiplas áreas do conhecimento, sendo a mesma uma das principais linhas envolvidas na consolidação da pesquisa translacional (*e.g.* estudos clínicos, pré-clínicos, *in vitro*, modelos animais, dosagens de parâmetros bioquímicos e genéticos) [6].

Um dos principais conceitos formulados a partir dos estudos previamente mencionados foi a “Hipótese do Fenótipo Pougador”, onde um estado de má nutrição durante o período fetal ou durante o início da infância é prejudicial para o desenvolvimento adequado das funções sistêmicas dos organismos, predispondo-os a doenças crônicas na vida adulta [25, 26]. Inicialmente, este conceito foi utilizado para explicar o risco aumentado de diabetes *mellitus* tipo 2 em indivíduos com baixo peso ao nascer [26]. Contudo, a “Hipótese do Fenótipo Pougador” também foi adaptada aos outros componentes dos sistemas biológicos, tornando-se um dos principais conceitos inseridos no modelo *DOHaD* para explicar a vulnerabilidade do Sistema Nervoso Central (SNC) e outros sistemas às variações ambientais durante o período fetal ou neonatal [27].

Adicionalmente, a “Teoria da Programação”, que propõe que as exposições a determinados eventos ao longo do desenvolvimento modulam a programação genética de distintos sistemas fisiológicos do organismo, foi explorada por muitos pesquisadores para analisar os principais aspectos da estrutura e do funcionamento do SNC que poderiam ser modificados permanentemente pela exposição a certos eventos adversos durante o período embrionário e neonatal [6, 27-33].

Desta forma, podemos considerar que exposições ambientais possuem influência significativa sobre condições de saúde ou de doença durante a infância e a vida adulta. Embora o foco do paradigma *DOHaD* tenha sido historicamente a nutrição, um grande número de pesquisas contribuiu para a compreensão dos efeitos de múltiplos outros fatores durante intervalos susceptíveis do desenvolvimento, os quais podem determinar o “fenótipo saúde” ou o “fenótipo doença” [34, 35].

1.2. NEUROFISIOLOGIA DO ESTRESSE

A compreensão científica do estresse e de suas ramificações para os diversos organismos a torna um dos principais processos envolvidos na coordenação fisiológica que mantém estável a maior parte dos sistemas (*e.g.* SNC, Sistema Respiratório, Sistema Cardiovascular), sendo de extrema importância fazer referência aos conceitos de homeostasia e alostasia, que envolvem um equilíbrio dinâmico entre intervalos de normalidade, o qual se encontra constantemente ameaçado por múltiplos estímulos ou distúrbios, externos ou internos [36].

A experiência de estresse é um componente comum da vida diária, sendo o mesmo um mecanismo adaptativo que mobiliza o organismo para responder apropriadamente a estímulos de desafio ou ameaça [37-40]. Desta forma, a compreensão das influências do estresse sobre o comportamento e a fisiologia dos organismos tem apresentado um aumento nas últimas décadas [39-47]. Considerando o contexto biológico, Hans Selye cunhou o termo estresse como uma resposta não específica do organismo para qualquer demanda homeostática [45, 48, 49]. Baseado nos conceitos de Claude Bernard, Walter Cannon (1932) inicialmente estudou o conceito de homeostasia para explicar as respostas adaptativas de luta ou fuga, sendo estas as respostas de um determinado organismo após a apresentação de um estímulo aversivo vivenciado ou percebido [45, 50-52].

As respostas adaptativas ao estresse habilitam o indivíduo a enfrentar um determinado estímulo ambiental ou uma ameaça, sendo para isso necessário o envolvimento e a ativação de complexo conjunto de subcomponentes (*e.g.* sistema endócrino, sistema “neurovegetativo”, comportamentos) [53-56]. Respostas apropriadas ao estresse podem promover a sobrevivência por alterarem processos fisiológicos e comportamentais [39, 40]. O principal componente endócrino das respostas ao estresse

envolve a ativação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (Eixo HHA), o qual evoca uma sequência de eventos neuroendócrinos que culmina na síntese e secreção de glicocorticoides (cortisol em humanos e primatas não humanos, por exemplo, e corticosterona em ratos, camundongos e várias outras espécies de roedores) [56-63]. A ação fisiológica primária da sinalização por glicocorticoides é a redistribuição de energia, aumentando a disponibilidade de energia livre para promover a capacidade de sobrevivência perante ameaças reais ou percebidas, denominados em conjunto como estressores. As ações catabólicas dos glicocorticoides demandam controle meticoloso de sua regulação para que o organismo não apresente alterações a longo prazo na função metabólica, podendo estas apresentarem ações deletérias permanentes [41-43, 56, 63-66]. A regulação da secreção de glicocorticoides, portanto, está sujeita à modulação por diversos mecanismos de regulação e sinalização por retroalimentação [60, 61, 67-70].

A ativação do Eixo HHA é controlada por uma quantidade relativamente pequena de neurônios parvocelulares localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) [61, 69]. Sob estímulo adequado de estresse ou modulação circadiana, estes neurônios liberam fatores, tais como o hormônio liberador de corticotropinas (CRH) [71-78] e a arginina-vasopressina (AVP) [72, 77, 79-85], que são direcionados na eminência mediana para a circulação porta-hipofisária [86]. Estes fatores então são conduzidos por veias portais na hipófise anterior, ocasionando a secreção e liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o qual atinge a circulação sistêmica e induz a síntese e a secreção de glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal [57, 63, 87-91].

Uma vez produzidos e liberados, os glicocorticoides são capazes de se ligar aos receptores mineralocorticoides (MR), de alta afinidade [68, 92], ou aos receptores glicocorticoides (GR), de baixa afinidade [93, 94]. Ambos os receptores são ativados

por ligantes em vários tecidos, incluindo neurônios e células gliais, e acredita-se que a ação primária dos glicocorticoides sobre a homeostase seja a regulação positiva ou negativa de fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica e de comportamentos, de maneira dependente do tipo celular envolvido neste processo [95-104]. A maior afinidade pelos MRs leva os mesmos a serem extensivamente acionados com baixos níveis de glicocorticoides [69, 70, 93, 94, 105-109]. Em contraste, a ligação aos GRs ocorre durante períodos de altos níveis circulantes de glicocorticoides, tal como ocorre em situações de estresse [56, 60, 61, 67, 69, 94, 101, 107, 110]. Considerando suas distribuições, GRs são abundantemente expressos por todo o cérebro, incluindo áreas macroscópicas primárias envolvidas na regulação do estresse: córtex pré-frontal medial (mPFC), hipocampo, amígdala, núcleo da estria terminal (BST), hipotálamo e tronco encefálico [96, 111, 112]. Já os MRs apresentam distribuições mais restritas que os GRs, incluindo o mPFC, hipocampo e amígdala [96, 113-115]. Por sua vez, estas áreas macroscópicas funcionais apresentam dimensões arquitetônicas microscópicas com distintas heterogeneidades funcionais [para revisão das distribuições microscópicas, [93, 116-119]. Desta forma, não é surpreendente que os principais mecanismos de retroalimentação negativa, controladores da resposta homeostática ativada por estressores, sejam mediados pelos GRs.

O sistema simpático adrenomedular (SAM) também responde ao estresse pelas duas vias do sistema “neurovegetativo” (também designado “Sistema Nervoso Autônomo”): o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP) [120, 121]. Estes sistemas regulam a função do organismo por influências mutuamente equilibradas [122, 123]. A ativação simpática neurovegetativa, ativada em resposta ao estresse, resulta na liberação de noradrenalina (NA) ou nos terminais sinápticos ou pela medula da glândula adrenal diretamente na corrente sanguínea [124,

125], preparando o organismo para ações apropriadas [126-130]. Além da NA, outros neurotransmissores (*e.g.* Adrenalina) estão envolvidos neste preparo [para revisão, 119, 131]. Este preparo é manifestado pelo aumento na frequência cardíaca, aumento da pressão arterial, entre outros [130, 132, 133]. Em ação sinérgica aos glicocorticoides, esta liberação noradrenérgica periférica amplifica alguns dos efeitos catabólicos ativados por estressores (*e.g.* catabolismo de proteínas, glicogenólise e lipólise) [134]. As ações centrais noradrenérgicas também são importantes nessa situação, sendo grande parte desta NA central originada no *locus coeruleus* (LC) [134, 135]. Outra importante estrutura, a amígdala, atua crucialmente nas respostas de comportamentos motivados por medo [136]. Ela se conecta ao hipocampo, hipotálamo e ao córtex cerebral, sendo, portanto, envolvida na percepção do estresse, em respostas neuroendócrinas e cardiovasculares [137-140]. Desta maneira, as catecolaminas promovem alterações diversas nas funções vegetativas basais, contribuindo para o equilíbrio ou para o desequilíbrio em resposta ao estresse [85, 141].

Além das catecolaminas, muitos peptídeos – moduladores da função sináptica – estão localizados nas principais estruturas encefálicas envolvidas na geração e na percepção de emoções e de estresse (*e.g.* hipotálamo, amígdala, núcleo da estria terminal, córtex orbitofrontal) [142]. Os neuropeptídeos são produzidos no SNC, mas também podem ocorrer em alguns tecidos periféricos (*e.g.* imunócitos), podendo modificar comportamentos e respostas fisiológicas em relação à estressores [143, 144]. Sendo assim, alguns neuropeptídeos podem ser mais liberados (1) em estados aversivos ou com emoções negativas (*e.g.* CRH, ACTH, substância P, prolactina), (2) em emoções positivas ou em respostas de recompensa (*e.g.* encefalinas, endorfinas) ou (3) em situações de estresse ou de enfrentamento ao estresse (*e.g.* neuropeptídeo Y, ocitocina) [143, 145].

Desta forma, alterações persistentes dos níveis de neuropeptídios envolvidos nas respostas ao estresse podem comprometer reações celulares e imunológicas [146-148]. Entretanto, os estudos dos neuropeptídios envolvidos com as respostas ao estresse são recentes, permanecendo ainda não esclarecida a associação entre os níveis centrais e periféricos destes componentes nos mais distintos organismos, em parte devido à ação da barreira hematoencefálica [149].

1.3. ESTRESSE E MODELOS ANIMAIS

Nas últimas décadas tem havido um grande interesse em saber quais são e de que forma distintos fatores do ambiente neonatal podem exercer influência na fisiologia e no comportamento de animais que foram expostos a diferentes intervenções durante o período perinatal [150, 151]. Animais submetidos ao estresse no período pré-natal e neonatal podem apresentar alterações cognitivas e mudanças neurodegenerativas de maneira estressor-dependente e/ou sexo-dependente [28, 36, 65, 152-156]. Os modelos de intervenções neonatais objetivam avaliar como uma determinada interferência ambiental nos primeiros dias de vida pode promover mudanças fisiológicas, bem como modificar as respostas neuroendócrinas e comportamentais na vida adulta destes animais [4, 7, 28, 36, 157-167].

De maneira geral, a primeira interação materno filial em mamíferos ocorre no útero, composta por alterações comportamentais e fisiológicas harmônicas no organismo materno, visando garantir e sustentar a gestação [168]. Após o parto e ao longo do início do período neonatal, as ligações materno-filiais são propriamente formadas [169]. Neste período, os neonatos estão mais vulneráveis aos estímulos ambientais e fatores externos (*e.g.* variações de odores ambientais, presença ou ausência

materna, estímulos sensoriais maternos) podem interferir diretamente nos diversos processos fisiológicos dos filhotes de maneira persistente [170-173].

Em modelos animais, a relação mãe-filhote é crítica para o desenvolvimento adequado da ninhada [174]. A interação materno-filial adequada é dependente de elementos sistêmicos (*e.g.* hormônios e neurotransmissores, como ocitocina, vasopressina, serotonina, noradrenalina, citocinas, opióides, dopamina), bem como de fatores ambientais, podendo tais fatores promover mudanças epigenéticas [28, 36, 135, 175-183]. Alguns dos principais efeitos de prejuízos nas interações materno-filiais podem envolver uma gama de mecanismos, incluindo mudanças nas secreções de citocinas pró-inflamatórias, neurotransmissores, além de modificações epigenéticas do material genético e alterações no remodelamento sináptico [184, 185].

Em 1957, Levine e colaboradores descreveram os efeitos da manipulação neonatal (MN) sobre o desenvolvimento e sobre as respostas comportamentais e endócrinas destes animais ao estresse [36, 164]. O procedimento de MN comumente envolve a remoção das ninhadas de suas caixas-moradia, retornando-os para suas caixas após alguns minutos. Em experimentos realizados em ratos da linhagem *Wistar* foi observado que filhotes separados repetidamente de suas mães durante o início do período pós-natal apresentam diferente responsividade a estressores na fase adulta dependendo da duração da separação [36, 47, 186-188]. Assim, filhotes submetidos à rápida separação no início da vida apresentam medidas comportamentais de medo reduzidas e uma atenuação na ativação neuroendócrina em resposta a estressores (*e.g.* diminuição das taxas de imobilidade e aumento de atividade exploratória em novos ambientes, menor aumento na secreção de glicocorticoides em resposta a uma variedade de estressores) quando comparados com animais controle [36, 110, 165, 186, 189, 190].

Outro paradigma utilizado para analisar as consequências biológicas da separação materna por longos períodos é denominado separação maternal (SM) ou privação materna [36, 157]. Quando filhotes submetidos à SM (separados diariamente de suas mães por aproximadamente três horas durante os primeiros dias de vida) são comparados aos animais submetidos à MN, na idade adulta, eles apresentam um aumento nas concentrações de CRH, uma potenciação da liberação de ACTH e de corticosterona em resposta ao estresse, bem como modificações comportamentais indicativas de vulnerabilidade ao fenótipo ansioso e depressivo [36, 153, 157, 158, 191-194].

Ambos os modelos animais supracitados (MN e SM) têm sido amplamente estudados para mimetizar a negligência parental durante o início da vida em humanos, sendo este considerado um dos mais fortes agentes estressores para os filhotes de roedores [195]. Em função de uma série de achados, podemos inferir que as mudanças comportamentais e fisiológicas de ratos MN e SM, quando adultos, são resultantes da combinação dos efeitos ambientais e da resposta imediata da mãe aos filhotes [36, 196].

Sendo assim, estudos que avaliam os efeitos de alterações sociais no início da vida em mamíferos parecem de extrema importância. Postula-se que comportamentos sociais não adequados podem ser indicativos de transtornos psiquiátricos, visto que o desenvolvimento anormal do SNC é relacionado aos principais transtornos (*e.g.* esquizofrenia, depressão, ansiedade) [35, 192, 197-201]. Tanto em humanos quanto em roedores, as interações sociais são importantes para o desenvolvimento normal, sendo que este tipo de interação parece ocorrer em maior frequência durante o período de adolescência [202-204]. Além disso, as interações sociais nos ratos se mostram mais sensíveis aos fatores ambientais [204-209].

1.4. ESTRESSE E RELEVÂNCIA CLÍNICA

A exposição a estressores no início da vida pode afetar o desenvolvimento encefálico, ocasionando alterações permanentes no comportamento e na fisiologia do SNC, sendo um componente destacado por pesquisas na fisiopatologia de transtornos de humor e de ansiedade [35, 200, 210]. Ambientes neonatais adversos, tais como a perda de um familiar ou negligência e abuso parental, são associados com danos funcionais neuropsicológicos e com vulnerabilidade para depressão em longo prazo [211].

Evidências clínicas reportam o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) como um possível candidato molecular capaz de mediar os efeitos ocasionados por estressores sobre estruturas e funções encefálicas [212-222]. O BDNF é uma proteína que age sobre a plasticidade e a sobrevivência neuronal [218, 222-225]. Esta neurotrofina é encontrada por todo encéfalo, sendo particularmente abundante no hipocampo e no córtex cerebral, áreas de relevante importância para o controle de humor, emoções e cognição [216, 218, 222, 226].

Um estudo morfológico demonstrou que tanto a expressão da proteína BDNF, do RNA mensageiro e do receptor dessa neurotrofina (receptor de tirosina cinase B, TrkB) estão significativamente diminuídos no córtex pré-frontal e no hipocampo de vítimas de suicídio, quando comparados aos sujeitos sadios [227]. Adicionalmente, dados da literatura relatam a diminuição de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo em modelos animais de mania induzidos por derivados anfetamínicos [215]. Alguns estudos forneceram evidências sugerindo que os níveis séricos ou plasmáticos de BDNF decrescem ao longo dos diferentes estados de humor em pacientes com diagnóstico de transtorno afetivo bipolar (TAB), embora algumas discrepâncias sobre estes achados também tenham sido descritas [213, 220, 222, 228].

O TAB é uma doença de curso recorrente, episódico, crônica e incapacitante, caracterizado por episódios recorrentes de mania, hipomania, depressão e estados mistos [229, 230]. Atualmente, a prevalência de TAB está estimada entre 1% e 4,5% da população mundial [229]. As bases biológicas deste transtorno ainda não foram completamente compreendidas, sabendo-se que múltiplos fatores (*e.g.* genéticos, bioquímicos, psicodinâmicos, socioambientais) podem estar envolvidos [229, 230].

Evidências sugerem que a exposição a diferentes tipos de estressores psicossociais (*e.g.* abuso sexual) nos estágios iniciais de desenvolvimento pode ser considerada um possível agente precipitador para o desenvolvimento de TAB [231, 232]. Resultados consistentes por pesquisadores deste grupo, utilizando o modelo de mania induzida por d-anfetamina, evidenciaram que os níveis de BDNF estão diminuídos em animais expostos à mania. Por sua vez, quando a mania foi revertida pela administração de estabilizadores de humor (*e.g.* carbolítio, ácido valpróico/valproato), os níveis séricos de BDNF aumentaram [215]. Outro dado de relevância apontou que os níveis séricos de BDNF estão diminuídos em quadros de depressão e de mania, correlacionando-se inversamente com a gravidade dos sintomas [213, 214, 217-221, 233]. Garantindo suporte a esse cenário, pacientes com diagnóstico para TAB e que passaram por experiências traumatizantes no passado apresentam níveis séricos de BDNF mais diminuídos em relação aos pacientes com diagnóstico para TAB sem trauma [231, 232]. Em conjunto, essas evidências indicam que variações nos níveis de BDNF sejam um possível mediador dos efeitos ambientais nesta psicopatologia.

Um dos domínios comuns dos polos maníaco ou hipomaníaco do TAB é um aumento significativo no comportamento de busca por recompensa [234-236]. A sinalização de recompensa é diretamente relacionada às ações centrais do neurotransmissor dopamina, sabidamente envolvido em quadros de psicose e outros

transtornos psiquiátricos [237]. Em roedores, a preferência por solução doce (solução de sacarose a 1%) é fortemente associada ao comportamento de busca de recompensa [238]. Em humanos, o TAB se caracteriza por distúrbios do comportamento alimentar e da regulação do peso corporal. A hipomania, a mania e a depressão melancólica se associam a anorexia, hipofagia e perda de peso, enquanto a depressão atípica se associa a um aumento no apetite, superalimentação e ganho de peso [239-246]. Pacientes com TAB exibem elevados índices de sobrepeso e de obesidade quando comparados com populações controle [241, 245-248]. Além disso, esta população está sob maior risco de desenvolver comorbidades cardiovasculares [249].

1.5. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Os ácidos graxos (AG) são componentes de diversos tipos de lipídeos, muitos deles componentes das membranas celulares. São encontrados em altas concentrações no SNC, constituindo aproximadamente metade do peso seco do encéfalo humano [250, 251]. Dos lipídeos encefálicos, aproximadamente 35% são ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) [250, 251]. Além de componentes estruturais (*e.g.* membranas celulares), os lipídeos cumprem funções metabólicas (*e.g.* energética, reserva) e regulatórias (*e.g.* autócrina, parácrina) para a manutenção do funcionamento adequado do organismo [252, 253].

Os AG podem ser classificados de acordo com o tamanho de sua cadeia carbônica (*e.g.* curta, média, longa, muito longa) e pelo número de ligações insaturadas presentes em sua molécula (*e.g.* saturados, monoinsaturados, poliinsaturados) [254]. AG de cadeia longa possuem mais de 12 átomos de carbono, sendo os AG com 22 ou mais átomos de carbono sendo referidos como AG de cadeia muito longa [255]. No encéfalo,

o ácido palmítico e o ácido esteárico são os mais abundantes AG saturados (isto é, que não possuem duplas ligações entre seus átomos de carbono), sendo o ácido oleico o mais abundante AG monoinsaturado (possui uma ligação dupla em sua estrutura carbônica) [255]. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), que apresentam duas ou mais ligações duplas entre seus átomos de carbono, apresentam em sua constituição química o padrão típico de ácidos carboxílicos, sendo compostos por uma terminação metila, uma cadeia hidrocarbonada e um grupo carboxílico [254, 256]. Os PUFA podem ser classificados em famílias de acordo com a posição da dupla ligação em relação ao terminal metila (ω , n-), sendo os ômega-3 PUFA (também designados ω -3 PUFA ou n-3 PUFA) aqueles que apresentam a primeira ligação dupla no terceiro carbono a partir do terminal metila. Já os AG do grupo ômega-6 PUFA (também designados ω -6 PUFA ou n-6 PUFA) apresentam a primeira ligação dupla no sexto carbono a partir do terminal metila [254]. Frequentemente os PUFA são expressos como fórmula esquemática ou como $N_c:d n-x$, onde: N_c representa o número total de carbonos da cadeia, d é o número de duplas ligações e x representa a posição da primeira insaturação a partir do terminal metila [257].

As membranas encefálicas são ricas em PUFA, tais como o ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6) e o ácido docosaexaenoico (DHA, 22:6 n-3), ambos PUFA de cadeia longa [258]. Em mamíferos, estes PUFA são derivados do ácido linoleico (LA, 18:2 n-6) e ácido α -linolênico (ALA, 18:3 n-3), os quais são considerados essenciais, pois esses animais são incapazes de sintetizar estes AG a partir de precursores mais simples, obtendo-os diretamente da alimentação [254, 256]. O AA e o DHA são essenciais para o crescimento encefálico e desenvolvimento cognitivo, sendo que eles também se acumulam no encéfalo e na retina durante a gestação e durante o início da vida pós-natal [259-261]. Considerando que a estrutura encefálica é rica em fosfoglicerídeos ricos em

AA e DHA [262], compreende-se que tais AG sejam necessários para o desenvolvimento encefálico adequado [250]. Durante a gestação, AA e DHA são transportados através da placenta para o sangue fetal [263, 264], e atualmente existe um aumento significativo nos estudos destes nutrientes sobre subsequentes padrões de saúde ou de doenças [259, 260, 265-268].

Os n-3 PUFA têm sido amplamente investigados por seus efeitos antiinflamatórios, enquanto os n-6 PUFA podem ser convertidos em AA e então metabolizados em eicosanoides derivados de n-6 PUFA, que apresentam ação pró-inflamatória [254, 261, 268]. Por outro lado, a sequência de reações bioquímicas de n-3 PUFA aumenta a quantidade de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) na membrana celular, que compete com o AA pela conversão enzimática de seus próprios metabólitos, os eicosanoides derivados de n-3 PUFA [254, 261, 268]. Estes n-3 PUFA eicosanoides são menos ativos e conseguem se opor parcialmente, antagonizando a ação pró-inflamatória dos eicosanoides derivados de n-6 PUFA [254, 261, 268]. Por mecanismos homeostáticos, o equilíbrio não inflamatório de eicosanoides (*e.g.* prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) é mantido por todo o organismo, influenciado primariamente pela razão das quantidades de n-3 e n-6 PUFA nas membranas celulares [254, 261, 268].

Estudos demonstraram que o DHA afeta as funções das barreiras hematoencefálicas, a fluidez da membrana neuronal e também regula alguns sistemas de neurotransmissores (*e.g.* glutamato, ácido gama-aminobutírico, serotonina, noradrenalina, acetilcolina, endocanabinóides) [258, 269]. Desta forma, o DHA apresenta efeito significativo sobre a dinâmica da membrana neuronal e, portanto, sobre as funções dos transportadores, receptores, moléculas transportadoras, neurotransmissores e enzimas [258, 261, 268, 270, 271]. Uma relação entre o EPA e o

SNC também foi traçada por estudos que o apontam como um possível agente neuroprotetor para certas doenças neurodegenerativas (*e.g.* Alzheimer, Doença de Parkinson) [261, 272]. Já um estudo com roedores demonstrou que o aumento no consumo de EPA foi capaz de estimular a expressão de mielina em encéfalos de ratos [273]. Um aumento na quantidade de mielinização pode ser associado com uma maior segregação de sinais eletroquímicos transmitidos através dos axônios, otimizando o processo de transmissão sináptica, com conseqüente melhoria cognitiva [274].

As principais fontes dietéticas de n-3 PUFA são peixes, alguns vegetais, nozes e óleos. EPA e DHA são encontrados em peixes de água fria (*e.g.* salmão, cavala, linguado, sardinha, atum, arenque), enquanto ALA é encontrado em linhaça, óleo de linhaça, óleo de canola, soja, óleo de soja, semente de abóbora, óleo da semente de abóbora, óleo da semente de perilla, nozes e óleo de nozes. Outras fontes de n-3 PUFA incluem krills e algas [275]. Os efeitos benéficos dos n-3 PUFA sobre a saúde derivam, principalmente, do EPA e do DHA ingerido. O ALA, derivado de fontes vegetais, necessita ser convertido para EPA e DHA no organismo [254, 261]. Contudo, muitas pessoas não apresentam este processo de conversão de maneira eficiente [254, 261]. Um ponto de grande debate entre estudiosos da área nutricional está na comparação entre as fontes vegetais e animais de EPA e DHA *versus* fontes vegetarianas de ALA [276].

Para a saúde geral, um equilíbrio entre as razões de n-3 PUFA e n-6 PUFA deve ser mantido. Autores sugerem que a razão adequada esteja entre 2:1 ou 4:1 (n-6/n-3), sendo níveis mais baixos apontados por outros pesquisadores [277-279]. Observando os padrões nutricionais ocidentais, constata-se uma abundância no consumo de alimentos ricos em n-6 PUFA (razão 15-20:1, n-6/n-3) [277, 280, 281]. Devido a incapacidade de síntese *de novo* de cadeias mais longas de PUFA (20-22 carbonos), tais como o EPA e o DHA, estas podem ser sintetizadas a partir de precursores menores de

PUFA, por uma série de reações (dessaturações e alongações) que ocorrem no fígado [254, 261, 282-285]. Por n-3 e n-6 PUFA competirem pelas mesmas enzimas, estas conversões ocorrem concomitantemente entre as duas classes de PUFA [251, 283, 284, 286, 287]. Em humanos, a conversão de n-3 PUFA de cadeia pequena em DHA ocorre com eficiência inferior a 5%, sendo necessário o consumo do componente de cadeia longa (DHA) diretamente a partir da alimentação [288].

1.6. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E RELEVÂNCIA CLÍNICA

Considerando as ações biológicas dos PUFA, dados provenientes de estudos utilizando modelos animais e clínicos (*e.g.* suplementação, deficiência, ausência total) contribuíram significativamente para a compreensão da relevância de seus efeitos sobre sistemas fisiológicos (*e.g.* cardiovascular, nervoso, imunológico) em progenitoras e seus descendentes (*e.g.* saúde, crescimento, desenvolvimento, função cognitiva, padrão psicológico) [254, 260, 261].

Nestes estudos, a quantidade de DHA tem sido referenciada com importante função na formação, desenvolvimento e funcionamento do SNC e da retina [289-291]. Como o DHA se acumula rapidamente nas membranas celulares durante a infância, seu fornecimento adequado é essencial para um melhor desenvolvimento neurológico e visual na vida precoce [289-291]. Além disso, os n-3 PUFA (*e.g.* DHA, EPA) são importantes no estudo de carências nutricionais, pois estão relacionados com o maior risco de transtornos psiquiátricos [292].

A hipótese de que a redução do consumo alimentar de frutos do mar está relacionada à maior prevalência de transtornos afetivos pode ser confirmada por um estudo que apontou uma menor prevalência de TAB em países que apresentam maior

consumo de alimentos marinhos [292-296]. Em estudos com humanos, também foram investigados os n-3 PUFA periféricos das membranas eritrocitárias de pacientes com TAB. Estudos encontraram menores níveis de AA e DHA nesses pacientes em comparação aos pacientes controle, podendo esta redução estar relacionada com o mecanismo de ação dos medicamentos estabilizadores de humor [297, 298]. Além disso, Ranjekar *et al.* reportaram menores níveis de n-3 PUFA e de duas enzimas antioxidantes plasmáticas (*e.g.* superóxido dismutase, catalase), indicando aumento do estresse oxidativo nestes pacientes [299]. Em relação à suplementação em n-3 PUFA associada ao tratamento convencional dos pacientes com TAB, estudos randomizados encontraram que a duração do tempo de remissão dos sintomas do TAB foi significativamente maior no grupo suplementado com n-3 PUFA [297, 300-310]. Outro estudo encontrou melhora dos sintomas clínicos no grupo suplementado com etil-EPA de 1 ou 2mg/dia em relação ao grupo placebo [311, 312]. Um estudo caso-controle apontou que, em eritrócitos, as taxas de DHA estavam significativamente diminuídas em adolescentes com transtorno depressivo maior [313]. Neste mesmo estudo, a suplementação com n-3 PUFA (baixa dose: 2,4g/dia, alta dose: 16,2g/dia) durante 10 semanas aumentou significativamente as concentrações eritrocitárias de EPA e DHA, diminuindo significativamente os sintomas depressivos no grupo submetido à dose alta, demonstrando índice de remissão dos sintomas de 40% em pacientes tratados com baixa dose e de 100% com alta dose [313].

Estudos com roedores visaram determinar as consequências de uma dieta deficiente em n-3 PUFA, em comparação a uma dieta adequada neste AG. DeMar *et al.* reportaram uma redução de 36% do DHA cerebral e alterações nos resultados dos testes para depressão e agressividade nos ratos com dieta deficiente em n-3 PUFA [314]. A dieta deficiente também induziu depleção de 70% do DHA cerebral, sendo maior nos

ratos separados durante o período neonatal [315, 316]. Em relação somente à separação materna, um estudo encontrou que este estressor, durante a vida precoce, possui efeitos persistentes sobre as concentrações de AG de ratos adultos, como a redução de n-3 PUFA plasmático [315-317].

Outros estudos com roedores apontam que a deficiência crônica de n-3 PUFA leva a prejuízos na atenção e no aprendizado, além de alterações nos índices de ansiedade, agressão e depressão [318-323]. A deficiência de DHA também é apontada como responsável por alterações na via dopaminérgica mesocorticolímbica, envolvida nos processos emocionais e de recompensa [324-326]. Outras pesquisas sugerem o envolvimento de n-3 PUFA com a via de sinalização BDNF/receptor tirosina cinase B (TrkB), explicando assim alguns dos efeitos neuroprotetores dos n-3 PUFA em modelos experimentais [327, 328]. Esta via de sinalização também tem sido proposta para explicar os efeitos de n-3 PUFA como agente estabilizador de humor em pacientes diagnosticados com TAB [329], incluindo a modulação de sinais de transdução, a redução de citocinas pró-inflamatórias, entre outras ações [303, 306, 308].

Para determinar se os dados disponíveis apoiam o uso de n-3 PUFA para uso clínico na prevenção e/ou tratamento de transtornos psiquiátricos, metanálises foram realizadas por grupos de pesquisadores [330-332] e como resultado, estudos clínicos randomizados demonstraram benefícios estatisticamente significativos na depressão unipolar e bipolar. Os resultados foram altamente heterogêneos, indicando ser importante examinar as características de cada trabalho individualmente, considerando diferentes abordagens metodológicas e execuções experimentais.

1.7. MITOCÔNDRIAS E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

As mitocôndrias são essenciais para o funcionamento celular adequado, produzindo a maior parte de adenosina trifosfatada (ATP) por oxidação fosforilativa [333-335]. Sua estrutura é composta por duas membranas (interna e externa), um espaço intramembranar e a matriz intracelular [333-335]. O espaço intramembranar mitocondrial contém a cadeia transportadora de elétrons, uma maquinaria molecular proteica utilizada para produção de energia [333-335]. A cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa dela dependente são processos cuja execução é levada a efeito por cinco complexos proteicos, sendo três desses (complexos I, III e IV) proteínas bombeadoras de prótons (H^+) para o espaço intramembranas, gerando e mantendo um gradiente necessário para a síntese de ATP pelo complexo V (ATP Sintase) [333-336]. A mitocôndria também está envolvida em processos relacionados à regulação homeostática, resposta ao estresse, sobrevivência celular e transdução de sinais [333-335]. O suporte energético neuronal é dependente da fosforilação oxidativa, pois neurônios apresentam capacidade limitada de obter energia diretamente pela glicólise quando o processo de fosforilação oxidativa é comprometido [337]. As mitocôndrias são distribuídas no corpo neuronal e nos axônios, terminais pré-sinápticos, em dendritos e nos espinhos dendríticos, sendo evidenciada por estudos a sua participação no processo de neuroplasticidade [333-335, 338-350]. Fica assim evidente a vulnerabilidade de células neuronais perante situações de disfunções mitocondriais.

As mitocôndrias também participam do metabolismo de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de processos sinalizadores (*e.g.* sinalização de cálcio, apoptose, necrose) [337, 350-352]. O estresse oxidativo aparentemente está envolvido na etiologia do envelhecimento e doenças neurodegenerativas, sendo as mitocôndrias as principais fontes de EROs intracelulares [350, 352]. A produção de EROs contribui para o dano

mitocondrial em um amplo espectro de processos patológicos, porém também é um importante agente de sinalização redox de organelas e células, agindo como moléculas sinalizadoras de processos fisiológicos adequados (*e.g.* plasticidade sináptica, aprendizado, memória) [333-335, 350].

Cada complexo da cadeia transportadora mitocondrial apresenta função própria, trabalhando associado a outras proteínas. Comprometimentos em qualquer parte dessa cadeia pode afetar diretamente o suprimento energético. Por outro lado, defesas antioxidantes mitocondriais, enzimáticas ou não, são capazes de detoxificar as EROs. O ânion superóxido é enzimaticamente convertido em peróxido de hidrogênio pela ação de metaloenzimas designadas superóxido dismutases (SOD) [353]. O peróxido de hidrogênio se difunde para o citosol, sendo convertido em água pela ação das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) [354-356]. Além disso, as mitocôndrias utilizam várias moléculas antioxidantes (*e.g.* coenzima Q10 ou ubiquinona, creatina, nicotinamida, glutathione) para interromper ou minimizar os processos oxidativos [333-335].

A disfunção mitocondrial tem sido amplamente estudada em pacientes com doenças neurológicas, incluindo transtornos neurodegenerativos e psiquiátricos [357-363]. Anormalidades estruturais, moleculares e funcionais na mitocôndria foram relacionadas a pacientes com transtornos psiquiátricos, sugerindo que o déficit mitocondrial possa ser suficiente para o desenvolvimento de um ou mais transtornos [333-335, 340-344, 346-349, 352, 358-364], permanecendo ainda incerto se estas alterações contribuem para o processo patológico ou se são apenas fenômenos sobrepostos. De uma forma ou de outra, sintomas psiquiátricos foram relatados em sujeitos com citopatias e encefalopatias mitocondriais. Portanto, ao considerarmos estes dados listados, evidenciamos o envolvimento de disfunções mitocondriais com os

mecanismos patológicos de alguns transtornos psiquiátricos. Contudo, os exatos mecanismos pelos quais alterações do metabolismo energético encefálico afetam os transtornos psiquiátricos não estão completamente elucidados.

As principais modificações ocasionadas por disfunções mitocondriais (*e.g.* diminuição de produção de ATP, formação de EROs, desequilíbrio antioxidante, estresse oxidativo, indução de apoptose) ocorrem nos estágios iniciais de diferentes doenças neurodegenerativas, sendo também associadas aos transtornos de humor [333, 334, 340, 343, 346, 349, 358, 361, 363]. Relacionando os elevados níveis de n-3 PUFA nas membranas encefálicas com o alto consumo de oxigênio por neurônios, evidências *in vitro* e *in vivo* evidenciam os n-3 PUFA como potentes agentes antiinflamatórios e antioxidantes, capazes de prevenir ou reverter o dano neuronal ocasionado pelo estresse oxidativo [365-387].

Assim, sabe-se que a exposição a fatores ambientais adversos no início da vida pode ocasionar alterações comportamentais e estruturais no SNC, as quais persistem a vida toda e afetam a plasticidade sináptica, o comportamento, as respostas ao estresse e a vulnerabilidade a quadros psiquiátricos (*e.g.* TAB). Neste sentido, este trabalho pretendeu avaliar, na fase adulta, a vulnerabilidade de animais submetidos a variações do ambiente perinatal em um modelo animal de TAB induzido por deficiência dietética de n-3 PUFA. Além disso, investigamos uma possível associação entre os níveis consumidos de n-3 PUFA e os níveis séricos de BDNF em uma população de adolescentes em idade escolar, reforçando o BDNF como um dos possíveis marcadores clínicos de transtornos como o TAB.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho pretendeu avaliar, na fase adulta, a vulnerabilidade de ratos machos da linhagem *Wistar* submetidos a variações do ambiente perinatal em um modelo animal de Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) induzido por deficiência dietética de n-3 PUFA. Além disso, investigamos uma possível associação entre os níveis consumidos de n-3 PUFA e os níveis séricos de BDNF em uma população de adolescentes em idade escolar, uma vez que o BDNF já foi sugerido como um possível marcador clínico de TAB.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o padrão de consumo de ração e de variação de peso corporal de ratos *Wistar* machos adultos manipulados e separados de suas mães durante o período neonatal e submetidos a uma deficiência nutricional em n-3 ácidos graxos poliinsaturados.

Avaliar os efeitos da manipulação neonatal e da separação materna sobre o nível sérico e hipocampal (*e.g.* proteína, expressão gênica) de BDNF em ratos *Wistar* machos adultos submetidos a uma deficiência dietética de n-3 ácidos graxos poliinsaturados, bem como sobre índices comportamentais de busca por recompensa (teste de preferência por solução doce), de sintomas anedônicos (nado forçado) e de atividade locomotora em resposta a um psicoestimulante (cloridato de anfepramona, derivado anfetamínico).

Investigar a existência de possíveis interações entre a exposição a uma deficiência crônica de n-3 ácidos graxos poliinsaturados e o estresse neonatal sobre

parâmetros de estresse oxidativo (*e.g.* atividades de enzimas antioxidante, quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio) no hipocampo, além de aspectos de morfológicos e funcionais mitocondriais (*e.g.* massa mitocondrial, potencial mitocondrial, atividades enzimáticas dos completos mitocondriais) hipocampais de ratos *Wistar* machos adultos.

Evidenciar possíveis correlações clínicas entre o consumo de n-3 ácidos graxos poliinsaturados e os níveis séricos de neurotrofina derivada do encéfalo (BDNF) em uma população local de adolescentes em idade escolar (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).

PARTE II

1. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Os materiais, métodos e resultados desta tese estão apresentados a seguir, da seguinte forma:

- **Capítulo 1:** Artigo publicado na Revista *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*.
- **Capítulo 2:** Artigo publicado na Revista *Neurochemical Research*.
- **Capítulo 3:** *Short Report* publicado na Revista *Lipids in Health and Disease*.

1.1. CAPÍTULO 1

**Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency
after exposure to early stress in rats.**

Artigo publicado na Revista Pharmacology, Biochemistry and Behavior.



Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress in rats

Charles Francisco Ferreira ^{a,b,c,*}, Juliana Rombaldi Bernardi ^c, Rachel Krolow ^b, Danusa Mar Arcego ^b, Gabriel Rodrigo Fries ^d, Bianca Wollenhaupt de Aguiar ^d, Gabrielle Senter ^c, Flávio Pereira Kapczinski ^d, Patrícia Pelufo Silveira ^{a,c}, Carla Dalmaz ^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Neurobiologia do Estresse, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Psiquiatria Molecular, Serviço de Psiquiatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2012

Received in revised form 28 February 2013

Accepted 7 March 2013

Available online 26 March 2013

Keywords:

n-3 PUFA deficiency

Neonatal handling

Maternal separation

Sucrose preference test

Locomotor activity

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

ABSTRACT

The exposure to adverse events early in life may affect brain development. Omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) deficiency has been linked to the development of mood and anxiety disorders. The aim of this study was to examine the interaction between variations in the early environment (handling or maternal separation) and the chronic exposure to a nutritional n-3 PUFA deficiency on locomotor activity, sucrose preference, forced swimming test and on serum and hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. Rats were randomized into Non-handled (NH), Neonatal Handled (H) and Maternal Separated (MS) groups. Pups were removed from their dams (incubator at 32 °C on postnatal days (PND) 1–10) during 10 min/day (H) or 3 h/day (MS). On PND 35, males were subdivided into diets adequate or deficient in n-3 PUFA for 15 weeks. H and MS gained weight differently, and animals receiving the n-3 PUFA deficient diet gained less weight. MS displayed a higher food consumption and higher consumption of sucrose solution during the second hour of exposure to the sucrose preference test. No differences were observed in the swimming test. H group had increased locomotion and showed a higher response to amfepramone. No significant effect was observed on serum BDNF levels. BDNF protein levels were decreased in animals receiving the n-3 PUFA deficient diet. We observed that early life environment and a mild n-3 PUFA deficiency are able to affect several behavioral aspects (food and sucrose consumption and locomotor response), and lead to a differential hippocampal BDNF metabolism in adult life.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Exposure to adverse events early in life may affect brain development profoundly, leading to long-lasting effects on neuronal structure and behavior and playing a role in the etiology of mood and anxiety disorders. Cognitive disturbances in later life are among the impairments of brain function that may be induced by early stress (Bremner and Narayan, 1998). Adverse early life environments, including loss of a

parent, parental abuse or neglect, are also associated with traits of altered physiological and neurobiological functioning and long-term vulnerability to depression (Agid et al., 1999). In animal models, the early relationship between mother and infant is critical for optimal development of the offspring (Hofer, 1994). Several years ago, Levine (1957) and other researchers described the effects of postnatal handling on the development of behavioral and endocrine responses to stress. The handling procedure usually involves removing rat pups from their cages, placing the animals together in small containers, and returning them to their cages—and their mothers—some minutes later. As adults, handled rats exhibit attenuated fearfulness (decreased freezing and increased exploration) in novel environments (Benetti et al., 2007) and a less pronounced increase in the secretion of adrenal glucocorticoids in response to a variety of stressors (Meaney et al., 1991). On the other hand, early maternal separation (MS; separation of pups from their dams for longer periods) has been used to mimic early-life parental neglect in humans and is considered one of the most powerful stressors

* Corresponding author at: Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo, Departamento de Bioquímica, UFRGS, CEP 90035-000, Porto Alegre/RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 5569; fax: +55 51 3308 5535.

E-mail addresses: neurocientista@hotmail.com (C.F. Ferreira), juliana.bernardi@yahoo.com.br (J.R. Bernardi), krolowrache@yahoo.com.br (R. Krolow), danusa_pf@hotmail.com (D.M. Arcego), gabrielrfries@gmail.com (G.R. Fries), biancavaguair@gmail.com (B.W. de Aguiar), gabismed@gmail.com (G. Senter), flavio.kapczinski@gmail.com (F.P. Kapczinski), raty@cpovo.net (P.P. Silveira), carladalmaz@yahoo.com.br (C. Dalmaz).

for rodent pups (Matthews et al., 1996). The effects of this disruption of the normal mother–infant interaction might involve a range of mechanisms, including changes in the secretion of stress hormones, proinflammatory cytokines, neurotransmitters, and epigenetic modifications mediated by DNA methylation, resulting in structural changes in neurons and synaptic remodeling (Kaffman and Meaney, 2007; Hennessy et al., 2010). Recent evidence has indicated that the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a molecular candidate for mediation of the effects triggered by early adverse events on brain structure and function (Cirulli et al., 2009).

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a dimeric protein that plays a key role in synaptic plasticity and neuronal survival (Manji et al., 2001; Poo, 2001). This neurotrophin is found throughout the brain and is particularly abundant in the hippocampus and cerebral cortex, areas thought to be critical for the control of mood, emotion, and cognition (Ernfors et al., 1990). A morphological study has shown that BDNF protein and mRNA expression, as well as that of its receptor, tyrosine kinase B (TrkB), are significantly decreased in the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus of suicide victims compared to control subjects (Pandey et al., 2008). Furthermore, BDNF is also decreased in the PFC and hippocampus in an animal model of mania induced by dextroamphetamine (Frey et al., 2006). Several studies have provided compelling evidence suggesting that serum and plasma BDNF levels change across the different mood states experienced in bipolar disorder, although some discrepancies are described. For instance, some studies have shown a decrease in BDNF in the manic state (Cunha et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2007) while others have not (Yoshimura et al., 2006).

Brain membranes are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as arachidonic acid (AA, 20:4 n-6) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3). In mammals, these PUFA are derived from linoleic acid (18:2 n-6) and alpha-linolenic acid (18:3 n-3), which must be obtained from their diet. It has been reported that chronic dietary n-3 PUFA deficiency leads to dramatic changes in the PUFA composition of neuronal membrane phospholipids in the frontal cortex and hippocampus (Aid et al., 2003), which is directly linked to impaired central nervous system (CNS) function (Bourre et al., 1989; Moriguchi et al., 2000). These long-chain PUFA may play an important role in the structure and function of many membrane proteins, including receptors, enzymes, and active transport molecules (Spector and Yorek, 1985; Youdim et al., 2000). Data suggest that rodents subjected to chronic n-3 PUFA dietary deficiency exhibit impaired attention and learning ability (Reibisck and Neuringe, 1997; Catalan et al., 2002) and changes in emotional status, including elevated behavioral indices of anxiety, aggression and depression (Fedorova and Salem, 2006). Dietary-induced DHA deficiency has been shown to produce dysregulation of the mesocorticolimbic dopaminergic pathway, which is involved in emotional and reward processes (Zimmer et al., 1998; Zimmer et al., 2000; Zimmer et al., 2002). On the other hand, convincing epidemiologic data associate diets high in omega-3 fatty acids with a lower risk of major depression, perinatal depression, and bipolar disorder (Noaghiul and Hibbeln, 2003; Hibbeln, 2009). Meta-analytic findings support the notion that the adjunctive use of omega-3 improves bipolar depressive symptoms (Simopoulos, 2002; Sarris et al., 2012). The BDNF/TrkB signaling pathway is one of the neurobiological mechanisms that have been recently proposed to explain the mood regulating effects of n-3 PUFA in bipolar disorders (Balanza-Martinez et al., 2011).

Based on the above findings, we hypothesized that neonatal stress and exposure to a dietary n-3 fatty acid deficiency later in life could interact to produce behavioral alterations related to psychiatric conditions. In addition, since evidence suggests that changes in BDNF levels might play a role in mediating shifts across different mood states, the present study examined the effects of early handling or maternal separation combined with chronic exposure to a

nutritional n-3 PUFA deficiency on locomotor activity in response to a psychostimulant, the sucrose preference test, the forced swimming test and serum and brain levels of BDNF in adult rats.

2. Methods

2.1. Subjects

Pregnant Wistar rats bred at our animal facility were randomly selected. They were single-housed in home cages made of Plexiglas (65 × 25 × 15 cm) with sawdust-covered floors and kept in a controlled environment (lights on between 07:00 h and 19:00 h, temperature at 22 ± 2 °C, cage cleaning twice a week, food and water provided) until birth. All litters were culled to eight pups within 24 h and were kept intact except for separation procedures, which were carried out between 15:30 h and 19:00 h. Included in this period were the time required to set up the incubator, to bring the cages from the facility and briefly habituate the dams to the new room, perform careful removal of the pups from the nest, the time of separation per se, the return of the pups to their dams and, again after a brief period, to return the cage to the animal facility. Researchers also changed gloves before the manipulation of each litter to avoid the spread of any odors from nest to nest.

The day of birth was considered as postnatal day (PND) 0, and weaning was on PND 21. One or two male pups were used per litter per group per experiment. After weaning, rats were housed two to three per cage in home cages similar to those described above. Ninety experimental male rats, derived from 17 different litters, were used in the different experiments. The number of animals used was estimated from previous experiments. After weaning, rats had free access to food (standard lab rat chow) and water until PND 35, when the experimental diets were offered (see below). Behavioral tasks were performed after chronic exposure to these diets, always between 10:00 h and 15:00 h. All animal treatments were approved by the institutional Research Ethics Committee (HCPA) and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

2.2. Neonatal stress model

Non-Handled group (NH): pups were left undisturbed with their dams until weaning. Dirty sawdust was carefully removed from one side of the cage, without disturbing the mother and the nest, and replaced by clean sawdust at that side by the principal researcher.

Neonatal Handled group (H): pups were gently removed from their home cages and placed into a clean cage lined with clean paper towels, inside an incubator set to 32 °C. After 10 min, pups were returned to their dams. This procedure was carried out in the first 10 days of life, after which pups were left undisturbed until PND 21.

Maternal-separated group (MS): pups were gently removed from their home cages and placed into a clean cage lined with clean paper towels, inside an incubator set to 32 °C. After 3 h, pups were returned to their dams. This procedure was carried out in the first 10 days of life, after which pups were left undisturbed until PND 21.

2.3. Dietary groups and diet composition

Rats were fed either a n-3 PUFA adequate (n = 44) or a n-3 PUFA deficient (n = 46) diet, both calorically and nutritionally balanced (PragSoluções Biotecnológicas®, São Paulo, Brazil), from PND 35 until the end of all behavioral tasks (for 18 weeks). Food consumption and body weight were measured weekly, using digital scales (Marte®, AS2000C, São Paulo, Brazil), in all groups (n = 13 to 17 for each of the 6 groups). Table 1 shows the composition and Table 2 shows the fatty acid composition of the study diets.

2.4. Behavioral tests

Rats were divided into two distinct lines of behavioral tests. The same animals used in the sucrose preference test were subjected to the forced swimming test 1 week later, while the remaining animals were tested solely for locomotor activity in response to a psychostimulant.

2.4.1. Sucrose preference test

This test consisted of a two-bottle choice paradigm in which rats are given the choice between consuming water versus sucrose. This paradigm has been used extensively to assess the effects of stress-induced anhedonia (Papp et al., 1991; Sampson et al., 1992). Rats were single-housed and habituated to drinking water from two bottles for 5 days ($n = 6–8$ per group). Each day, the water bottles were switched (left or right). At the start of the experiment (day 5), potential bottle and side preference(s) was assessed by measuring water/water intake and balancing the position of the bottles (left or right). On day 6, rats were exposed to sucrose (0.1%) for 24 h. The position of the sucrose bottle (left or right) was again balanced between groups and cages. In addition, the position of the water and sucrose bottles (left or right) was switched every 30 min from 13:00 to 16:00 h. After this 3 h period, rats were left undisturbed and their overnight fluid intake was measured on the next afternoon (13:00 h–day 7); bottle sides were then switched again. Once again, fluid intake was measured at 13:00 h on day 8. The preference for sucrose over water was used as a measure for the animals' sensitivity to reward.

2.4.2. Forced swimming test (FST)

The FST is a 2-day procedure in which rats are forced to swim under conditions they cannot escape. On day 1, when rats are forced to swim, they initially engage in escape-like behaviors, but eventually adopt a posture of immobility in which they move only as required to keep their heads above water. When retested 24 h later, rats become immobile very quickly; however, administration of antidepressant treatments between forced swim exposures can significantly increase their escape-like behaviors, an effect that has been correlated with antidepressant activity in humans (Cryan et al., 2002). At the start of the experiment, rats ($n = 6–8$ per group) were placed individually in plastic cylinders (75 × 30 cm) filled to a 54-cm depth with water at 23 ± 1 °C and forced to swim for 15 min. At the end of this period, rats were removed from the water, dried with towels, and placed in a

Table 1

Dietary composition of experimental diets. Both diets provided 4100 kcal/1000 g; lipids provided 21.95% of total calories. The main difference between the two diets was the concentration of vegetable oil containing polyunsaturated fatty acids n-3 (n-3 PUFA). The n-6:n-3 PUFA ratios for the adequate and deficient diets were 1.83 and 5.02 respectively.

Ingredients (in g)	n-3 PUFA adequate (per 1000 g)	n-3 PUFA deficient (per 1000 g)
Isolated soy protein	200	200
Dextrose	200	200
Maltodextrin	150	150
Corn starch	150	150
Sucrose	100	100
Coconut fat	60	66
Canola oil	32	34
Flaxseed oil	8	0
Microcrystalline cellulose	50	50
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
Chlorine	2.50	2.50
L-cystine	2.50	2.50
Butylated hydroxytoluene (BHT)	0.02	0.02

Table 2

Fatty acid composition of experimental diets.

Fatty acid composition (% of the total fatty acids content)	n-3 PUFA adequate (per 1000 g)	n-3 PUFA deficient (per 1000 g)
8:0	1.0	1.2
10:0	1.3	1.6
12:0	21.4	23.7
14:0	11.6	12.4
15:0	0.0	0.0
16:0	8.9	9.1
16:1 n-7	0.1	0.1
17:0	0.1	0.1
18:0	4.1	3.9
18:1 n-9	30.9	31.5
18:1 n-7	1.6	1.6
18:2 n-6	11.2	10.9
20:0	0.4	0.4
18:3 n-6	0.3	0.3
20:1 n-9	0.7	0.7
18:3 n-3	6.3	2.2
20:2 n-6	0.0	0.0
24:0	0.2	0.2
24:1 n-9	0.1	0.1

warm enclosure for 10 min. All cylinders were emptied and cleaned between each evaluation. Twenty-four hours after the first forced swimming test (day 2), rats were retested for 5 min under identical conditions. Latency (time in seconds until immobility), immobility (frequency and time in s), swimming (frequency and time in s), and climbing counts (frequency and time in s) were evaluated as dependent variables, as per Carlezon et al. (2003) and (Detke et al., 1997). Performance was recorded in both days and analyzed using locally developed time evaluation software (v2.0, UFRGS, Instituto de Biociências, Porto Alegre, Brazil). Latency to immobility was defined as the time at which the rat first took on a stationary posture that did not reflect attempts to escape from the water (Lucki, 1997). To qualify as immobility, this posture had to be clearly visible and maintained for ≥ 2.0 s.

2.4.3. Locomotor response to amfepramone

On the first day, rats ($n = 6–8$ per group) received 1 mL/kg saline via intraperitoneal injection. Immediately afterwards, the animals were allowed to stay in a neutral box for 10 min, and then were gently put in a circular open field (36 cm high × 78 cm wide) made from clear Plexiglas, with the floor (black Plexiglas) divided into 25 sections: 16 external rectangles (14 × 10 cm, located in the periphery), 8 intermediate rectangles (15 × 19 cm) and one inner square (10 × 10 cm). The movements of the animals during their time spent in the apparatus were filmed directly. The number of crossings between squares was measured over a 30-min period. On day two, rats were injected with 10 mg/kg amfepramone i.p. and the same procedures were performed. The number of crossings between the different segments of the apparatus (external, intermediate and internal sections) and total mobility were recorded manually and analyzed using the aforementioned software application (UFRGS, Porto Alegre, Brazil). Total ambulation (expressed as number of line crossings) was also analyzed.

2.4.4. Biochemical analysis: sample collection

A week after behavioral tests, animals were decapitated in random order using a small animal guillotine (Insight EB271, São Paulo, Brazil) after 6 h of fasting. Trunk blood was collected, brains were removed and the hippocampus dissected and stored at -70 °C. After centrifugation (3000 rpm, 15 min), serum was stored at -70 °C until analysis. Six to eight hippocampus samples, from the same animals per experimental group, were analyzed for both protein and mRNA analysis. Animals who received amfepramone for locomotor response testing were not used for blood or brain sampling.

2.4.5. Serum BDNF assay

Serum BDNF levels were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, using a commercial kit (ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor – BDNF – Sandwich ELISA kit, Millipore, USA). Serum samples were diluted in a cold homogenization buffer consisting of 100 mM Tris/HCl pH 7.0, 2% bovine serum albumin (BSA), 0.1 M NaCl, 4 mM EDTA.Na2, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide and 1% protease inhibitor cocktail (PIC). Microtiter plates (96-well, flat-bottomed) were coated for 24 h with the samples, diluted 1:2 in sample diluent, and the standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of BDNF. Sequential processing of the samples was performed according to the manufacturer's instructions.

2.4.6. Hippocampal BDNF assays

Hippocampal BDNF levels were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, using a commercial kit (BDNF E_{max}® Immunoassay system, Promega, USA). Briefly, brain slices were homogenized in a lysis buffer containing 137 mM NaCl, 2.5 M KCl, 10 mM Hepes, 0.6 mM EDTA pH7.9, 1%SDS, 10% glycerol and 1% PIC. Microtiter plates (96-well, flat-bottomed) were coated for 24 h with the samples, diluted 1:10 in sample diluent, and the standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of BDNF. Sequential processing of the samples was performed according to the manufacturer's instructions.

Sample protein concentrations were determined using the Lowry method (Lowry et al., 1951), with bovine serum albumin as the standard.

Hippocampal BDNF gene expression was measured by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using an inventoried TaqMan FAM/MGB assay (Applied Biosystems, ID assay Rn01484928_m1). Expression values were normalized by endogenous control expression of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) using a TaqMan VIC/MGB inventoried endogenous control assay (Applied Biosystems, 4352340E). Total RNA was isolated using TRI Reagent (Sigma), according to the manufacturer's protocol. Quantification was performed using NanoDrop. Reactions were run in an ABI Prism 7500 sequence detection instrument, which directly detects the RT-PCR product without downstream processing. Total RNA (200 ng) was converted into cDNA using Superscript III (Invitrogen). Reactions were carried out in a total volume of 12 µl containing 6 µl of 2× TaqMan Gene Expression Master Mix (ROX, Amplitaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, and MgCl₂), 0.6 µl of 20× TaqMan Gene Expression Assay, 0.6 µl of 20× TaqMan Endogenous Control, 3.8 µl of water and 1 µl of cDNA solution. The cycling program consisted of 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s each at 95 °C and 1 min at 60 °C. All reactions were performed in triplicate. Relative expression levels were determined by the ddCt method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.5. Statistical analyses

Allocation of subjects to the various testing conditions was random. Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA; neonatal intervention and diet as factors), with Student–Newman–Keuls post-hoc analysis when appropriate. Repeated measures ANOVA was used for assessment of locomotor response to amfepramone (using neonatal intervention and diet as independent factors and performance after saline or amfepramone administration as a dependent factor). Data are expressed as mean ± standard error (SEM). Statistical significance was defined as $p \leq 0.05$ for all analyses.

3. Results

Fig. 1 shows weight gain during the treatment. A main effect of early intervention was demonstrated [two-way ANOVA, $F(2,84) = 17.96$, $P < 0.001$], as the handled and maternal-separated groups gained weight differently from non-handled animals (Student–Newman–Keuls

post-hoc test, $P < 0.05$). There was also an effect of diet [two-way ANOVA, $F(1,84) = 7.47$, $P < 0.01$], as animals receiving the n-3 PUFA deficient diet gained less weight.

Considering chow intake at the end of the treatment (Fig. 2), we observed an effect of early intervention [two-way ANOVA, $F(2,34) = 5.29$, $P < 0.01$]; maternal-separated animals displayed higher food intake (Student–Newman–Keuls post hoc test, $P < 0.05$ compared to the other two groups).

Intake of sucrose solution was assessed after 15 weeks of treatment. The results are displayed in Fig. 3. During the first hour of exposure to sucrose solution, no effect was observed (two-way ANOVA, $P > 0.05$ in all cases). During the second hour of exposure, there was a main effect of early intervention [Fig. 3B; two-way ANOVA, $F(2,37) = 4.16$, $P < 0.05$], as maternal-separated groups showed a higher consumption compared to non-handled animals (Student–Newman–Keuls post hoc test, $P < 0.05$). No significant differences were observed during the other periods of assessment (two-way ANOVA, $P > 0.05$ in all cases). Additionally, the total amount of fluid ingested (water + sucrose solution) and the amount of water ingested were similar in all groups during all periods of analysis (two-way ANOVA, $P > 0.05$ in all cases; data not shown).

There were no between-group differences in immobility or any other parameters [two-way ANOVA, $P > 0.05$, data not shown] during the forced swimming test (data not shown).

In order to assess responsiveness to a psychostimulant drug, locomotor activity was evaluated in an open field apparatus after exposure to saline or amfepramone 1 mg/kg. The results are displayed in Fig. 4. Repeated measures ANOVA showed an effect of the drug [$F(1,41) = 230.14$; $P < 0.001$], indicating the stimulant property of amfepramone. Additionally, there was a group effect [$F(2,41) = 7.13$; $P = 0.002$], as the handled group exhibited increased locomotion (Student–Newman–Keuls post hoc test, $P < 0.05$ compared to the other two groups), and an interaction between group and drug effects [$F(2,41) = 7.57$; $P = 0.002$], since the handled group showed a higher response to amfepramone than the other groups.

BDNF levels were evaluated in serum. No significant effect of any intervention was observed on serum BDNF levels (two-way ANOVA, $P > 0.05$, data not shown). Additionally, mature BDNF levels and gene expression were measured in the hippocampus (see Fig. 5 for these results). Gene expression for BDNF showed a marginally significant group effect (two-way ANOVA, $F(2,32) = 3.13$, $P = 0.057$), as neonatal handled animals showed a trend for higher relative mRNA expression than the non-handled group (Fig. 5A). However, mature

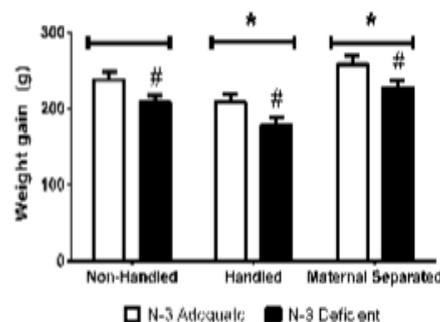


Fig. 1. Weight gain (g) during the 15 weeks of treatment for non-handled, neonatal-handled and maternal-separated groups, exposed or not to an n-3 PUFA deficient diet. Data expressed as mean ± SEM. *Two-way ANOVA showed that handled and maternal-separated groups gained weight differently from non-handled animals ($p < 0.001$; Student–Newman–Keuls post-hoc, $p < 0.05$, indicating that each group was different from the others). #There was also a diet effect (two-way ANOVA, $p < 0.01$), where animals receiving n-3 PUFA deficient diet gained less weight than animals fed n-3 PUFA adequate diet.

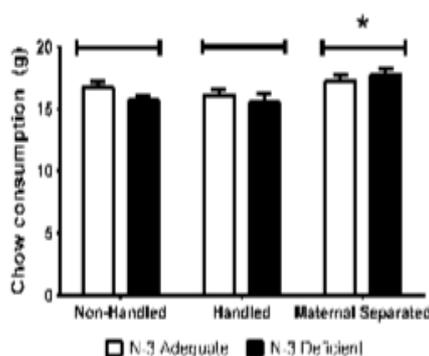


Fig. 2. Chow intake (g) measured during the last week of treatment for non-handled, neonatal-handled, and maternal-separated groups, exposed or not to an n-3 PUFA deficient diet. Data expressed as mean \pm SEM. * Two-way ANOVA ($p < 0.01$; Student–Newman–Keuls post-hoc test, $P < 0.05$) showed that maternal-separated animals exhibited higher chow intake compared to the other two groups.

BDNF protein levels were decreased in animals fed a n-3 PUFA deficient diet [two-way ANOVA, $F(1,41) = 4.66$, $P = 0.037$; Fig. 5B].

4. Discussion

In this study, both early life environment and exposure to a omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) deficient diet were shown to influence behavioral and neurochemical outcomes in adult life. Mild n-3 PUFA deficiency led to a reduction in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels. Additionally, exposure to different intervention types during the neonatal period (H or MS) had distinct effects on weight gain and food consumption: MS gained more weight and displayed increased dietary and sucrose intake, whereas neonatally handled animals gained less weight than animals in the other groups. H animals also displayed an enhanced response to psychostimulants.

In order to ensure an adequate neuronal function, the brain needs high levels of n-3 PUFA, particularly docosahexaenoic acid (DHA), and any changes in their quantity or availability in phospholipid membranes can compromise behavioral and cognitive performance (Fedorova and Salem, 2006). In the setting of n-3 PUFA deficiency, as experimentally induced in this study, the brain should be inefficient at synthesizing DHA. DHA deficiency during brain maturation reduces plasticity and jeopardizes cerebral function in adulthood (Bhatia et al., 2011). Adequate levels of dietary DHA seem crucial for the establishment of long-term neuronal resilience for optimal brain performance, provide enhanced mechanisms against neurological disorders (Riemer et al., 2010), and may also mitigate the risk of mental disorders and cognitive deficits in adulthood (Bhatia et al., 2011).

There has been a marked shift in the fatty acid composition of the typical Western diet over the last five decades, with an increased ratio of n-6:n-3 PUFA intake (Ailhaud et al., 2006). These changes in dietary habits have been suggested as potential factors in the etiology of psychiatric diseases and mood disorders (McNamara and Carlson, 2006). In this context, some studies have shown that dietary n-3 PUFA deficiency can play a role in the prevalence and severity of depression (Edwards et al., 1998; Riemer et al., 2010), although some authors have stressed that a causal relationship between these factors cannot be established (Liperoti et al., 2009). There is also clear evidence that exposure to chronic stress in early life increases vulnerability to affective disorders (Plotsky and Meaney, 1993; Meaney et al., 1996). Therefore, we proposed that cerebral n-3 PUFA deficiency could compromise stress resistance and investigated the relative and combined effects of chronic n-3 PUFA deficiency and early-life stress (induced by neonatal handling and maternal separation) on the behavior and BDNF levels of rats. As mentioned above,

we were able to demonstrate that serum BDNF is not decreased in a single generation after n-3 PUFA depletion, even with concomitant early trauma, although its protein levels were decreased in the hippocampus.

Previous research has shown that plasma levels of BDNF are altered in different moods (Cunha et al., 2006; Yoshimura et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2007). However, there are discrepancies between studies. Fernandes et al. (2011) showed that BDNF levels were significantly decreased during episodes of mania and depression, thus suggesting a potential role for this molecule as a peripheral biomarker for the progression of bipolar disorder. Considering that our treatment induced reductions in hippocampal BDNF levels in rats fed chronically with an n-3 PUFA deficient diet, we hypothesize that a decline in central BDNF levels could be one of the first central nervous system (CNS) changes to occur in psychiatric disorders, preceding peripheral changes in BDNF levels.

Interestingly, the expression of BDNF mRNA remained unchanged; therefore, the reduction in BDNF levels observed in animals receiving an n-3 PUFA deficient diet may be due to distinct post-translational mechanisms, including distinct processing to a mature protein and degradation of the BDNF molecule. The mechanisms underlying these posttranslational modifications in the specific case of BDNF processing have yet to be identified.

The n-6:n-3 ratio of PUFA in the diet is also considered important. Our deficient diet intervention was able to reduce hippocampal BDNF protein levels. As shown by Clarke et al. (2009), animals subjected to a MS stress paradigm display an increased n-6:n-3 fatty acid ratio, primarily driven by a reduction in plasma n-3 fatty acid concentrations at baseline; therefore, a mild dietary deficiency in n-3 PUFA, as used in our study (n-6:n-3 ratios: adequate diet, 2:1; deficient diet, 6:1) may have additive effects in an already depleted individual. In a recent paper, Bhatia et al. (2011) demonstrated that n-3 PUFA deficiency reduced brain levels of docosahexaenoic acid (DHA) and increased the n-6:n-3 ratio, as well as reduced BDNF levels and signaling through the tyrosine kinase B (TrkB) BDNF receptor (in proportion to brain DHA levels) and reduced activations of a BDNF-related signaling molecule, cyclic AMP response element binding protein (CREB), in brain regions. According to the authors, rats fed an n-3 deficient diet showed a significant decrease in BDNF and phospho-CREB levels in the hypothalamus and hippocampus, but not in the frontal cortex, compared with rats exposed to an n-3 adequate diet. All three studied areas also showed a significant decrease in levels of phosphorylated TrkB. Our results are consistent with these findings, and in our sample, a slight increase in the n-6:n-3 ratio was enough to reduce BDNF protein levels in the hippocampus.

On the subject of neonatal interventions and hippocampal BDNF, Garoflos et al. (2005) reported that the early handling procedure activates neurotransmitter receptors that lead to increased intracellular calcium, phosphorylation of the transcription factor CREB and increased BDNF expression in the neonatal rat hippocampus. Lippmann et al. (2007) reported a decrease in hippocampal mature BDNF levels in MS animals, although pro-BDNF levels remained unchanged. In our study, we did not find any differences in BDNF levels among non-handled, H or S. This discrepancy may have been due to differences in handling protocols, as some authors used shorter or longer handling periods [e.g., 2, 4 and 8 h only on postnatal day 1 (Garoflos et al., 2005) or 15 or 180 min from postnatal day (PND) 2 to 14] (Lippmann et al., 2007). Another possibility is that age at quantification of BDNF levels may influence study results: Garoflos et al. (2005) measured BDNF levels 2, 4 or 8 h after the end of the early handling procedure, whereas Lippmann et al. (2007) measured BDNF levels after PND 95. In our study, we analyzed hippocampal and serum BDNF levels in animals at PND 150. Although it is recognized that BDNF is the most important neurotrophic factor for CNS function, time-course studies of exposure to different nutritional patterns have

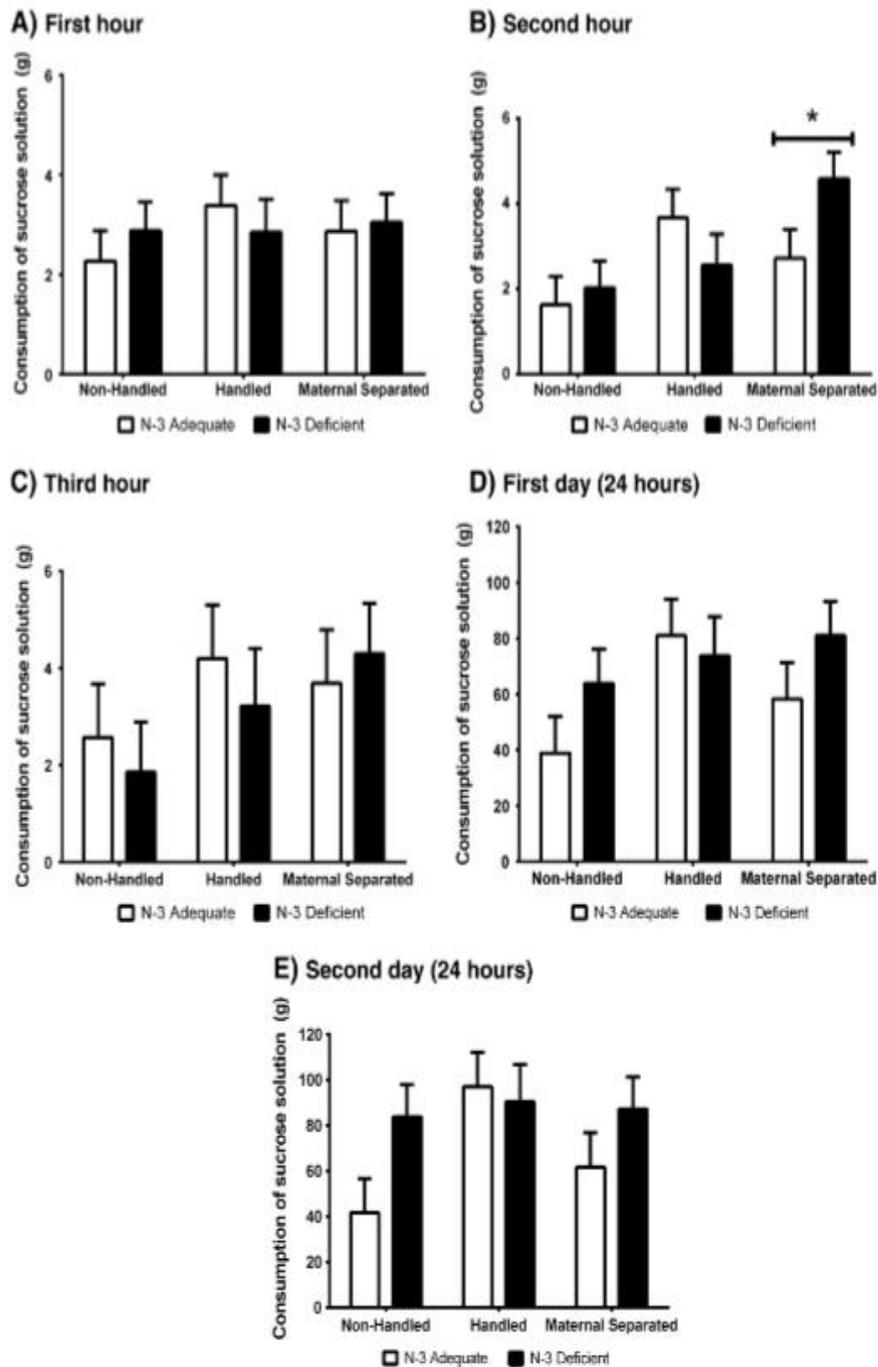


Fig. 3. Mean consumption of sucrose solution (g) measured over two consecutive days for non-handled, neonatal handled and maternal separated groups subjected or not to a n-3 PUFA deficient diet. Sucrose intake was measured at first hour (panel A), second hour (panel B), and third hour (panel C). The figure also shows total intake after first day (24 h) (panel D) and second day (24 h) (panel E) of 1% sucrose exposure. Data expressed as mean \pm SEM. *Two-way ANOVA ($p < 0.05$; Student–Newman–Keuls post-hoc, $P < 0.05$) showed that maternal-separated animals exhibited higher sucrose intake than animals in the other two groups, only during hour 2. No significant differences were observed during the other periods of assessment (two-way ANOVA, $P > 0.05$).

yet to assess aging responses. In the present study, we investigated whether different dietary n-3:n-6 ratios in association with neonatal environment stress might modify BDNF levels. It is possible that changes in hippocampal BDNF levels after neonatal interventions may be more pronounced during the initial stages of life. More studies are required to investigate whether mechanisms related to BDNF processing may change differently during development after early life stress. A keener understanding of the brain regions and neural

circuitry associated with persistent alterations induced by early life stressors and the development of mood disorders is necessary.

Concerning food intake and body weight variation, our findings demonstrate that animals fed a diet deficient in n-3 PUFA exhibit lower body weight, and that MS per se increased food intake as compared with the other interventions, with no interaction with n-3 PUFA deficiency. This finding may indicate that interventions during critical periods can have long-term effects on behavior,

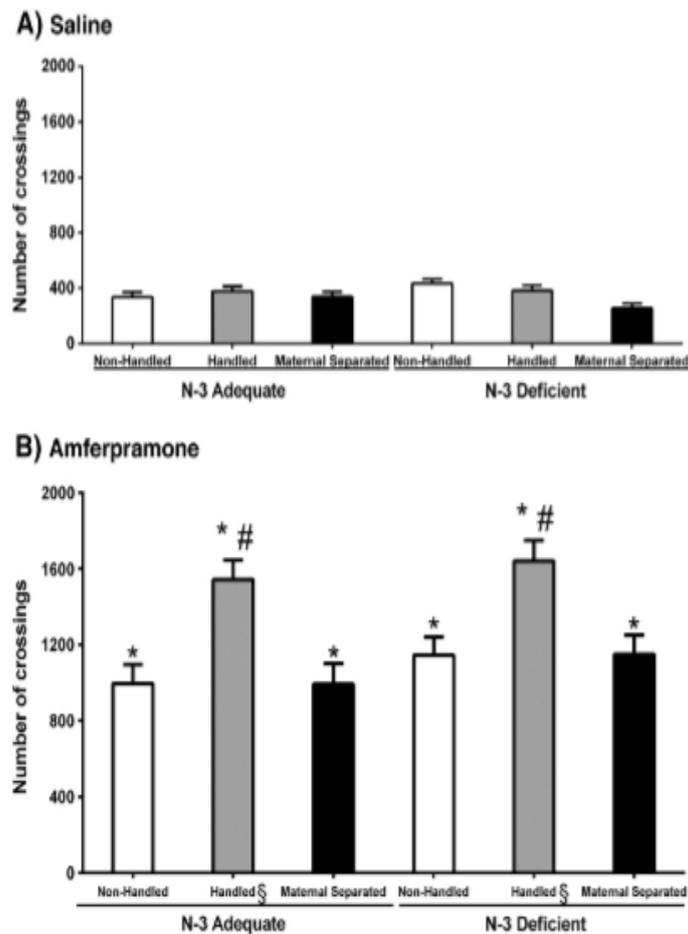


Fig. 4. Locomotor activity in an open field test for non-handled, neonatal-handled and maternal-separated groups, exposed or not to an n-3 PUFA deficient diet. Animals were tested for 30 min after administration of saline (panel A) or amferpramone (panel B) 1 mg/kg. Data presented as mean \pm SEM. *Repeated measures ANOVA showed an effect of the drug ($P < 0.001$) and $^{\text{a}}$ group effect ($P = 0.002$; Student–Newman–Keuls post hoc test, $P < 0.05$ compared to the other two groups), as well as an interaction between the group and drug effects [$F(2,41) = 7.57; P = 0.002$], since the handled group showed a higher response to amferpramone than the other groups. #Significant interaction of group \times amferpramone effects ($P = 0.002$).

emotion and metabolism (Pervanidou and Chrousos, 2007), and that the separation process may cause neonatal plastic changes in the CNS, leading to a consistent increase in food consumption and/or possible metabolic changes. Considering the current obesity epidemic and the high prevalence of early stress (e.g. fetal exposure to chronic maternal diseases such as diabetes or hypertension, tobacco smoking or drugs) (Valsamakis et al., 2006; Bamfo and Odibo, 2011) coupled with a sedentary lifestyle and fat- and sugar-rich diets, it seems important to assess how early stress acts to increase body weight and food intake.

The hedonic state of animals was assessed with the use of sucrose as a rewarding agent. The rewarding value of sucrose is associated with its induction of dopamine release in the nucleus accumbens (Smith, 2004). In rats, increases or, alternatively, no change in sucrose consumption have been shown in early life chronic stress models (Vazquez et al., 2005; Silveira et al., 2010). Our results show that animals in the maternal-separated group ingested a larger amount of 1% sucrose solution only in the second hour after the start of sucrose presentation, suggesting that, perhaps, these animals need more time to achieve satiety. This, in turn, suggests that MS can lead to a distinct positive reinforcement response after a fixed time interval, expressed peculiarly as increased sucrose intake. This effect does not appear to be related to the hedonic aspect. Peripheral and/or central mechanisms related to satiety may contribute to these behavioral findings.

Mathieu et al. (Mathieu et al., 2008; Mathieu et al., 2011) also investigated the synergistic effects of maternal separation and n-3 PUFA deficiency on behavioral outcomes in rats. These studies reported that MS group fed n-3 PUFA deficient diet was more fearful and anxious, while their ability to cope with an aversive avoidance task remained unaffected. Besides, both n-3 PUFA deficiency and MS increased reward response and impulsivity, suggesting that n-3 PUFA deficit could be an environmental risk increasing vulnerability to depressive-like response induced by chronic stress. In this research, n-3 PUFA deficient diet was applied after the weaning process (PND 35). On the other hand, Mathieu et al. started the nutritional deficiency during pregnancy until adulthood of the litters. Besides, n-6:n-3 ratios were more intense in Mathieu et al. research than in ours. These discrepancies should be taken into account when comparing the results displayed by these researches.

The open field test was used to assess locomotor and exploratory activity, as well as to evaluate anxiety-like behavior. Although motor alterations associated with dietary n-3 PUFA deficiency have already been described in rats (Vancassel et al., 2005) and mice (Raygada et al., 1998), our results demonstrated no differences in baseline locomotor activity (after i.p. administration of saline) among any of the experimental groups. Some studies have reported that H (Meaney et al., 1991; Silveira et al., 2005) exhibit an increase in the number of crossings in this behavioral test, whereas separated animals exhibit decreased exploratory activity, as compared with

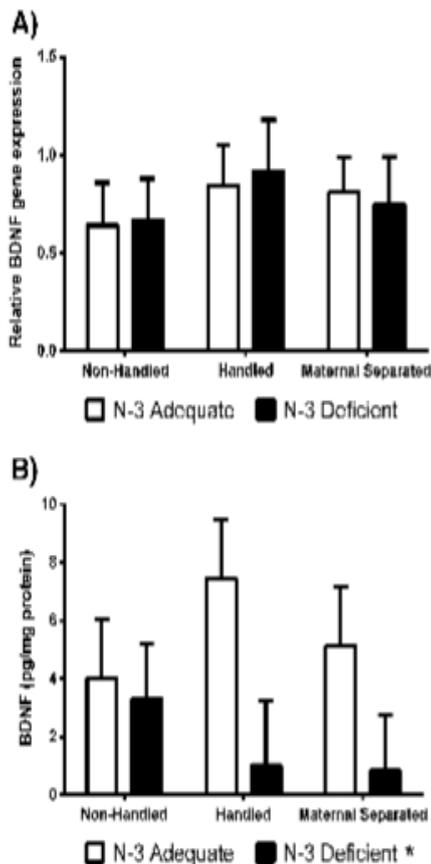


Fig. 5. Hippocampal BDNF gene expression and protein levels for non-handled, neonatal-handled and maternal-separated groups, exposed or not to a n-3 PUFA deficient diet. Data presented as mean \pm SEM. When BDNF gene expression (panel A) was evaluated in the hippocampus, there was a marginally significant group effect (two-way ANOVA, $P = 0.057$), as neonatal handled animals displayed a higher relative mRNA expression than the non-handled group. However, mature BDNF protein levels were decreased in animals fed an n-3 PUFA deficient diet (two-way ANOVA, $p = 0.037$, panel B).

non-handled animals (Zhu et al., 2010), although some authors reported no differences in the exploratory activity of H (Brake et al., 2004) or MS (Diehl et al., 2007) animals. Brake et al., 2004 (Brake et al., 2004) reported that H animals were less responsive to an amphetamine challenge (0.5 mg/kg, i.p.). This discrepancy with our data could be explained by the drug treatment used to analyze the locomotor response: Brake (Brake et al., 2004) used amphetamine, whereas we used amfepramone. In our study, although amfepramone increased motor activity in all groups, synergism was only observed with the handled group. Hyperactivity has been associated with reduced cortical dopaminergic activity and higher activity in the nucleus accumbens (Piazza et al., 1991; Blondeau and Dellu-Hagedorn, 2007). Dopaminergic activity has been reported to be decreased in the nucleus accumbens in handled animals (Silveira et al., 2010), and our results may be related to the finding reported above.

5. Conclusions

In this study, we observed that the early life environment and a mild n-3 PUFA deficiency are able to affect behavior, metabolism and hippocampus BDNF levels in rats. These data give rise to two possible future research approaches. The first, with a focus on handling and locomotor behavior, suggests investigation of potential changes in dopaminergic neurotransmission. The second, focusing

on the main effects of an n-3 PUFA deficient diet on palatable food consumption, could assess whether maternal separation increases the effects of n-3 PUFA deficient diet on hedonic mechanisms related to food intake. The possible mechanisms involved in the processing of brain neurotrophin levels, particularly BDNF, after early life stress also warrant assessment in view of their importance for behavioral modulation. Further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in these processes.

Acknowledgments

This work was supported by grants from PRONEX FAPERGS/CNPq 10/0018.3 and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)–Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Brazil), the National Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) and the National Council for Scientific and Technological Development, INCT Translacional Medicine (CNPq) 573671/2008-7. (CNPq, Brazil). None of the authors have any conflicts of interest related to this study, whether financial or of any other nature.

References

- Ajid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, et al. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1999;4(2): 163–72.
- Aid S, Vancassel S, Poumes-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Lavielle M. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J Lipid Res* 2003;44(8):1545–51.
- Ailhaud G, Massiera F, Weill P, Legrand P, Alessandri JM, Guesnet P. Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Prog Lipid Res* 2006;45(3):203–36.
- Balanza-Martinez V, Fries GR, Colpo GD, Silveira PP, Portella AK, Tabares-Seisdedos R, et al. Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 2011;11(7):1029–47.
- Bamfo JE, Odibo AO. Diagnosis and management of fetal growth restriction. *J Pregnancy* 2011;2011:640715.
- Benetti F, Andrade de Araujo P, Sanvitto GL, Lucion AB. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Dev Psychobiol* 2007;49(3):258–64.
- Bhatia HS, Agrawal R, Sharma S, Huo YX, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. *PLoS One* 2011;6(12):e28451.
- Blondeau C, Dellu-Hagedorn F. Dimensional analysis of ADHD subtypes in rats. *Biol Psychiatry* 2007;61(12):1340–50.
- Bourre JM, Francois M, Youyou A, Dumont O, Piciotti M, Pascal G, et al. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr* 1989;119(12):1880–92.
- Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 2004;19(7):1863–74.
- Bremner JD, Narayan M. The effects of stress on memory and the hippocampus throughout the life cycle: implications for childhood development and aging. *Dev Psychopathol* 1998;10(4):871–85.
- Carlezon Jr WA, Mague SD, Andersen SL. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* 2003;54(12):1330–7.
- Catalan J, Moriguchi T, Slotnick B, Murthy M, Greiner RS, Salem Jr N. Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* 2002;116(6):1022–31.
- Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ. Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33(4):573–85.
- Clarke G, O'Mahony SM, Hennessy AA, Ross P, Stanton C, Cryan JF, et al. Chain reactions: early-life stress alters the metabolic profile of plasma polyunsaturated fatty acids in adulthood. *Behav Brain Res* 2009;205(1):319–21.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23(5):238–45.
- Cunha AB, Frey BN, Andreatza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 2006;398(3):215–9.
- Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol* 1997;5(2): 107–12.
- Diehl LA, Silveira PP, Leite MC, Crema LM, Portella AK, Billodre MN, et al. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Res* 2007;1144:107–16.
- Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord* 1998;48(2–3):149–55.

- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 1990;5(4):511–26.
- Fedorova I, Salem Jr N. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75(4–5):271–89.
- Fernandes BS, Gama CS, Cereser KM, Yatlam LN, Fries GR, Colpo G, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res* 2011;45(8):995–1004.
- Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* 2006;79(3):281–6.
- Garoflos E, Stamatakis A, Mantelas A, Philippidis H, Stylianopoulou F. Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. *Brain Res* 2005;1052(2):187–95.
- Hennessy MB, Deak T, Schiml-Webb PA. Early attachment-figure separation and increased risk for later depression: potential mediation by proinflammatory processes. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34(6):782–90.
- Hibbeln JR. Depression, suicide and deficiencies of omega-3 essential fatty acids in modern diets. *World Rev Nutr Diet* 2009;99:17–30.
- Hofer MA. Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatr Suppl* 1994;397:9–18.
- Kaffman A, Meaney MJ. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *J Child Psychol Psychiatry* 2007;48(3–4):224–44.
- Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 1957;126(3270):405.
- Liperoti R, Landi F, Fusco O, Bernabei R, Onder G. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence. *Curr Pharm Des* 2009;15(36):4165–72.
- Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 2007;25(10):3091–8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265–75.
- Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997;8(6–7):523–32.
- Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczynski F, et al. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry* 2007;61(2):142–4.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 2001;7(5):541–7.
- Mathieu G, Denis S, Lavielle M, Vancassel S. Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;78(6):391–401.
- Mathieu G, Oualian C, Denis I, Lavielle M, Gisquet-Verrier P, Vancassel S. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation together with early maternal separation increases anxiety and vulnerability to stress in adult rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85(3–4):129–36.
- Matthews K, Wilkinson LS, Robbins TW. Repeated maternal separation of preweaning rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood. *Physiol Behav* 1996;59(1):99–107.
- McNamara RK, Carlson SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75(4–5):329–49.
- Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, et al. The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 1991;16(1–3):85–103.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 1996;18(1–2):49–72.
- Moriguchi T, Greiner RS, Salem Jr N. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* 2000;75(6):2563–73.
- Noaghiul S, Hibbeln JR. Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders. *Am J Psychiatry* 2003;160(12):2222–7.
- Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Dwivedi Y. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11(8):1047–61.
- Papp M, Willner P, Muscat R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;104(2):255–9.
- Pervanidou P, Chrousos GP. Post-traumatic stress disorder in children and adolescents: from Sigmund Freud's "trauma" to psychopathology and the (Dys)metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2007;39(6):413–9.
- Piazza PV, Rouge-Pont F, Deminiere JM, Kharoubi M, Le Moal M, Simon H. Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res* 1991;567(1):169–74.
- Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18(3):195–200.
- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(1):24–32.
- Raygada M, Cho E, Hilakivi-Clarke L. High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offspring's aggressive behavior, immobility in the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity. *J Nutr* 1998;128(12):2505–11.
- Reibisck S, Neuringer M. Omega-3 fatty acid deficiency and behavior: a critical review and directions for future research. *Handbook of essential fatty acid biology: biochemistry, physiology and behavioral neurobiology*. Totowa, NJ: Humana Press; 1997. p. 397–426.
- Riemer S, Maes M, Christophe A, Rief W. Lowered omega-3 PUFAs are related to major depression, but not to somatization syndrome. *J Affect Disord* 2010;123(1–3):173–80.
- Sampson D, Muscat R, Phillips G, Willner P. Decreased reactivity to sweetness following chronic exposure to mild unpredictable stress or acute administration of pimozone. *Neurosci Biobehav Rev* 1992;16(4):519–24.
- Sarris J, Mischoulon D, Schweitzer I. Omega-3 for bipolar disorder: meta-analyses of use in mania and bipolar depression. *J Clin Psychiatry* 2012;73(1):81–6.
- Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci* 2005;23(1):93–9.
- Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci* 2010;28(1):111–8.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002;21(6):495–505.
- Smith GP. Accumbens dopamine mediates the rewarding effect of orosensory stimulation by sucrose. *Appetite* 2004;43(1):11–3.
- Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 1985;26(9):1015–35.
- Valsamakis G, Kanaka-Gantenbein C, Malamitsi-Puchner A, Mastorakos G. Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:138–47.
- Vancassel S, Aid S, Pifferi F, Morice E, Nosten-Bertrand M, Chalou S, et al. Cerebral asymmetry and behavioral lateralization in rats chronically lacking n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biol Psychiatry* 2005;58(10):805–11.
- Vazquez V, Farley S, Giros B, Dauge V. Maternal deprivation increases behavioural reactivity to stressful situations in adulthood: suppression by the CCK2 antagonist U365,260. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;181(4):706–13.
- Yoshimura R, Nakano Y, Hori H, Ikenouchi A, Ueda N, Nakamura J. Effect of risperidone on plasma catecholamine metabolites and brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorders. *Hum Psychopharmacol* 2006;21(7):433–8.
- Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 2000;18(4–5):383–99.
- Zhu X, Peng S, Ma X, Li T. Effect of maternal deprivation on emotion and expression of dopamine transporter in adult rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010;35(1):32–7.
- Zimmer L, Hembert S, Durand G, Breton P, Guilloteau D, Besnard JC, et al. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neurosci Lett* 1998;240(3):177–81.
- Zimmer L, Delion-Vancassel S, Durand G, Guilloteau D, Bodard S, Besnard JC, et al. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 2000;41(1):32–40.
- Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, et al. The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2002;75(4):662–7.

1.2. CAPÍTULO 2

Mitochondrial and oxidative stress aspects in hippocampus of rats submitted to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress.

Artigo publicado na Revista Neurochemical Research.



Mitochondrial and Oxidative Stress Aspects in Hippocampus of Rats Submitted to Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency After Exposure to Early Stress

Charles Francisco Ferreira^{1,3} · Juliana Rombaldi Bernardi⁴ · Diego Carrilho da Silva³ · Natividade de Sá Couto-Pereira^{2,3} · Carina de Souza Mota^{2,3} · Rachel Krolow^{2,3} · Simone Nardin Weis² · Letícia Pettenuzzo^{2,3} · Flávio Kapczinski⁵ · Patrícia Pelufo Silveira^{1,3,5} · Carla Dalmaz^{1,2,3}

Received: 26 January 2015 / Revised: 5 July 2015 / Accepted: 22 July 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Chronic dietary long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) deficiency may lead to changes in cortex and hippocampus neuronal membrane phospholipids, and may be linked to impaired central nervous system function. Particularly docosahexaenoic acid deficiency appears to be involved in neuropsychiatric disorders. On the other hand, adverse events early in life may also profoundly affect brain development, leading to long-lasting effects on neurophysiology, neurobiology and

behavior. This research assessed if neonatal stress and a dietary n-3 PUFAs deficiency could interact to produce hippocampal alterations related to mitochondrial functions in adult rats. There were no effects of diet, neonatal intervention or interactions on superoxide dismutase or catalase enzymatic activities, mitochondrial membrane potential and respiratory chain complexes. Rats fed n-3 PUFAs deficient diet displayed higher levels of glutathione peroxidase and catalase activity, higher free radicals

✉ Charles Francisco Ferreira
neurocientista@hotmail.com
Juliana Rombaldi Bernardi
juliana.bernardi@yahoo.com.br
Diego Carrilho da Silva
dipolska@gmail.com
Natividade de Sá Couto-Pereira
natividade.pereira@gmail.com
Carina de Souza Mota
carina.mota@gmail.com
Rachel Krolow
krolowrachel@yahoo.com.br
Simone Nardin Weis
simonenardin@yahoo.com.br
Letícia Pettenuzzo
leticiaPETTENUZZO@gmail.com
Flávio Kapczinski
falvio.kapczinski@gmail.com
Patrícia Pelufo Silveira
raty@cpovo.net
Carla Dalmaz
carladalmaz@yahoo.com.br

- ¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências - Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil
- ² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica - Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil
- ³ Laboratório de Neurobiologia do Estresse, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-000, Brazil
- ⁴ Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HICPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- ⁵ Faculdade de Medicina (FAMED) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

production and higher thiol content compared to rats fed n-3 PUFAs adequate diet. There were interactions among diets and neonatal stress, since glutathione peroxidase, free radicals production and thiol content were increased in groups that were subjected to neonatal interventions fed n-3 PUFAs deficient diet. Additionally, reduced mitochondrial potential was observed in handled animals. Total thiol revealed a neonatal stress effect, since animals subjected to neonatal interventions displayed lower thiol content. In conclusion, we observed that a chronic treatment with deficient n-3 PUFAs diet, from the puberty period on, increased free radicals production and imbalanced antioxidant enzymes activities, and these increases were higher in animals subjected to neonatal interventions.

Keywords Neonatal handling · Maternal separation · n-3 polyunsaturated fatty acid depletion · Respiratory chain complexes · Oxidative stress · Hippocampus

Introduction

Brain tissue is rich in lipids [1, 2], containing a large percent of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as arachidonic acid (AA, 20:4 n-6) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) [3, 4]. In mammals, these PUFAs are derived from linoleic acid (18:2 n-6) and α -linolenic acid (18:3 n-3), which must be obtained from diet [5–7]. Reports indicate that chronic dietary n-3 PUFAs deficiency leads to changes in the PUFAs composition of neuronal membrane phospholipids in the frontal cortex and hippocampus [8], and these changes may be linked to impaired central nervous system (CNS) function [6, 9, 10]. These PUFAs may play an important role in the structure and function of many membrane proteins, including enzymes, receptors and transporter molecules, altering the course of development of the brain [7]. Evidence points that glial cells, neurons, and mitochondria might be modified by altered PUFAs constitution in their membrane phospholipids [11]. Although the normal CNS development requires PUFAs, some authors report that DHA deficiency appears to be particularly involved in the establishment of neuropsychiatric disorders [7, 12]. Nutritional DHA deficiency has been shown to alter gene expression [13, 14], protein-membrane interactions [15], learning processes [16, 17], neurogenesis, and brain metabolism [14, 18–21]. Some studies suggest that rodents exposed to chronic n-3 PUFAs dietary deficiency exhibit impaired learning and attention [22] as well as changes in the emotional status, such as development of depression, aggression and anxiety [23].

Besides being important for mitochondrial function, there are evidence that DHA content may protect from

perinatal stress induced dysfunction involving the modulation of mitochondrial dynamics and function [24]. Reports indicate that DHA and its metabolites promote cell survival by activation of anti-apoptotic or neuroprotective gene expression [25–27], and that PUFAs promote mitochondrial biogenesis, modulating genes associated with energy metabolism and adenosine triphosphate (ATP) production [14, 28]. The brain tissue displays a high rate of oxidative metabolism [29, 30], and the elevated DHA content in mitochondrial phospholipids indicates that DHA-phospholipids are important for mitochondrial functions [31].

The mitochondrial phosphorylation system is located in the lipid bilayer of mitochondrial inner membrane and it is composed of five multi-protein enzyme complexes (I–V). The passage of electrons releases energy, which is stored in a proton gradient across the inner mitochondrial membrane. This electrochemical gradient results in the mitochondrial membrane potential and builds up the driving force for complex V, generating ATP [32, 33]. The respiratory chain is highly oxygen dependent and constantly produces low physiological levels of reactive oxygen species (ROS), which may increase in consequence of mitochondrial disturbances [33–35].

These ROS are essential for many physiological functions, at low concentrations [36]. Approximately 90 % of cellular ROS can be attributed to mitochondria and are the result of leakage of electrons from respiratory chain [37, 38]. Detoxification of reactive superoxide anions by superoxide dismutase (SOD) activity results in the production of hydrogen peroxide, which is reduced to water, catalyzed either by catalase or glutathione peroxidase activities [39, 40]. The proteins of the respiratory chain and PUFAs in mitochondrial membranes are key targets of ROS deleterious effects, leading to membrane depolarization and subsequently impaired mitochondrial function [34, 41]. The oxidative damage of mitochondrial membranes generates loss of mitochondrial potential, representing one early apoptosis characteristic [42, 43]. The resulting severe changes in mitochondrial membrane potential are pointed to be important for the onset and progression of neurodegenerative diseases [35, 44].

The exposure to adverse events early in life may also profoundly affect brain development, leading to long-lasting effects on neurophysiology, neurobiology and behavior, probably having a key role in the etiology of mood and anxiety disorders [45]. Two animal models focusing these adverse early life events are neonatal handling and maternal separation. The neonatal handling is a procedure of removing rat pups from their cages, placing the animals together in small containers, and returning them to their cages some minutes later [46]. Handled animals, as adults, exhibit less pronounced increase in the secretion of adrenal

glucocorticoids in response to a variety of stressors and attenuated fearfulness in novel environments [47]. Contrariwise, early maternal separated animals (separation of pups from their dams for longer periods) may involve a range of effects, in adulthood, including changes in the secretion of neurotransmitters, proinflammatory cytokines, increased stress hormones, and epigenetic modifications, resulting in synaptic remodeling and structural changes in neurons [48, 49]. Studies from our research group illustrated that adult male rats exposed to neonatal stress exhibit increased DNA breaks index, impairment in nitric oxide production and altered antioxidant enzymatic activity level in hippocampus [50–54].

Based on the above findings, we hypothesized that neonatal stress and exposure to a dietary n-3 PUFAs deficiency later in life could interact to produce alterations related to mitochondrial function. In addition, since evidence suggests that changes in hippocampus might play a role in mediating shifts across neurogenesis and behavior, the focuses of these analyses are on mitochondrial membrane potential, mitochondrial mass, respiratory complexes activities, and levels of reactive oxygen and antioxidant enzymes activities in adult rats' hippocampus.

Methods

Subjects

Pregnant *Wistar* rats bred at our animal facility were randomly selected. They were single-housed in home cages made of Plexiglas (65 × 25 × 15 cm) with sawdust-covered floors and kept in a controlled environment (lights on between 07:00 h and 19:00 h, temperature at 22 ± 2 °C, cage cleaning twice a week, food and water provided). All litters were culled to eight pups within 24 h after birth and were kept intact except for separation procedures, which were carried out between 15:30 h and 19:00 h. Included in this period were the time required to set up the incubator, to bring the cages from the facility and briefly habituate the dams to the new room, perform careful removal of the pups from the nest, the time of separation per se, the return of the pups to their dams and, again after a brief period, to return the cage to the animal facility. Researchers also changed gloves before the manipulation of each litter to avoid the spread of any odors from nest to nest.

The day of birth was considered as postnatal day (PND) 0, and weaning was on PND 21. One or two male pups per litter were used per group per experiment. After weaning, rats were housed two to three per cage in home cages similar to those described above. Forty experimental male rats, derived from 20 different litters, were used in the different experiments. After weaning, rats had free access

to food (standard lab rat chow) and water until PND 35, when the experimental diets were offered (see below). After 15 weeks of exposure to the experimental diets, animals were decapitated in random order using a small animal guillotine (Insight EB271[®], São Paulo, Brazil) after 6 h of fasting. Brains were removed, and hippocampi were rapidly dissected. Trunk blood was also collected and, after centrifugation (3000 rpm, 15 min), serum was stored at -70 °C until analysis.

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Neonatal Stress Model

Non-Handled group (NH): pups were left undisturbed with their dams until weaning.

Neonatal Handled group (H): pups were gently removed from their home cages and placed into a clean cage lined with clean paper towels, inside an incubator set to 32 °C. After 10 min, pups were returned to their dams. This procedure was carried out in the first 10 days of life, after which pups were left undisturbed until PND 21.

Maternal-Separated group (MS): pups were gently removed from their home cages and placed into a clean cage lined with clean paper towels, inside an incubator set to 32 °C. After 3 h, pups were returned to their dams. This procedure was carried out in the first 10 days of life, after which pups were left undisturbed until PND 21.

In all experimental groups, dirty sawdust was carefully removed from one side of the cage, without disturbing the mother and the nest, and replaced by clean sawdust at that side by the principal researcher.

Dietary Groups and Diet Composition

Rats were fed either an n-3 PUFAs adequate ($n = 20$) or an n-3 PUFAs deficient ($n = 20$) diet, both calorically and nutritionally balanced (PragSoluções Biociências[®], São Paulo, Brazil), from PND 35 until the end of chronic exposure (15 weeks) period. Food consumption and body weight were measured weekly, using digital scales (Marte[®], AS2000C, São Paulo, Brazil), in all groups ($n = 4–7$ for each of the 6 groups, data not shown). Table 1 shows the study diets composition.

Ethical Aspects

All animal treatments were approved by the Institutional Ethical Committee (Ethical Committee, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, number 09-410) and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Sciences (ICLAS). All efforts were taken to minimize pain or discomfort.

Table 1 Dietary composition of experimental diets

	n-3 PUFAs adequate (for 1000 g)	n-3 PUFAs deficient (for 1000 g)
Isolated soy protein	200	200
Dextrose	200	200
Maltodextrin	150	150
Sucrose	100	100
Coconut fat	60	66
Canola oil	32	34
Flaxseed oil	8	0
Microcrystalline cellulose	50	50
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
Chlorine chloride	2.50	2.50
L-cystine	2.50	2.50
Butylated hydroxytoluene (BHT)	0.02	0.02

Both diets provided 4100 kcal/1000 g; lipids provided 21.95 % of total calories. The main difference between the two diets was the concentration of vegetable oil containing polyunsaturated fatty acids n-3 (n-3 PUFAs). The n-6 and n-3 PUFAs ratios for the adequate and deficient diets were 1.7 and 6.5 respectively

Evaluation of Oxidative Status Parameters

For these measurement, hippocampi were homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA. The homogenate were centrifuged at 1000×g for 10 min at 4 °C and the supernatant were used.

Determination of Superoxide Dismutase Activity

SOD activity was determined using the RANSOD kit (Randox Labs., USA) based on the procedure described by Delmas-Beauvieux [55]. This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to form a formazan dye that is assayed by spectrophotometric analysis at 492 nm at 37 °C. The inhibition in the production of the chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample; one unit of SOD causes 50 % inhibition of the rate of reduction of INT under the conditions of the assay.

Determination of Glutathione Peroxidase Activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined according to Wendel [56] with modifications. The reaction was carried out at 37 °C in a solution containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 1.1 mM EDTA,

0.44 mM sodium azide, 0.5 mM NADPH, 2 mM glutathione and 0.4 U glutathione reductase. The activity of GPx was measured using tert-butylhydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction ratio. GPx activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg of protein.

Determination of Catalase Activity

Catalase (CAT) activity assessment is based upon establishing the rate of H₂O₂ degradation by spectrophotometric analysis at 240 nm at 25 °C [57]. CAT activity was calculated in terms of micromoles of H₂O₂ consumed per minute per mg of protein, using a molar extinction coefficient of 43.6 M⁻¹ cm⁻¹.

Evaluation of Free Radicals Production by the Chemical Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)

The samples were incubated with 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA 100 μM) at 37 °C for 30 min. DCFH-DA was cleaved by cellular esterases and the DCFH formed was eventually oxidized by reactive oxygen/nitrogen species. The formation of the fluorescent derivative dichlorofluorescein (DCF) was monitored by excitation and emission wavelength of 488 and 525 nm, respectively, using a SpectraMax M5. The amount of reactive oxygen/nitrogen species was quantified using a DCF standard curve using DCF standard curve and results were expressed as nmoles of DCF formed per mg of protein [58].

Determination of Total Thiol Content

This assay measures protein and non-protein thiols; the latter is mainly represented by the reduced form of glutathione and the method is based in the reduction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) by thiol groups, which becomes oxidized (disulfide), yielding a yellow compound (TNB), whose absorption is measured by spectrophotometric analysis at 412 nm. The sulfhydryl content is correlated to reduced thiol groups (including reduced glutathione) and inversely correlated to the oxidative damage to proteins. Results are reported as nmol TNB/mg protein [59].

Mitochondrial Mass and Membrane Potential Measurement

MitoTracker was used for mitochondrial function analysis in cell suspensions of hippocampus obtained by gentle mechanical dissociation using a fire-polished Pasteur

pipette with PBS (100 mM, pH 7.4) containing collagenase (0.01 mg/mL) to a density of about 200,000 cells/mL. The dissociated contents were then filtered into a sterile 50 mL Falcon tubes (BD Biosciences) through 40 μ m nylon cell strainer (Cell Filter Strainer—BD Biosciences) and kept on ice until mitochondrial staining. MitoTracker Red (MTR or Chloromethyl-X-rosamine) and MitoTracker Green (MTG) dyes were used to assess mitochondrial potential ($\Delta\psi$) and mass, respectively. Samples as described earlier were stained with 100 nM MTR and 100 nM MTG for 45 min at 37 °C in a water bath in a dark room, according to the method described by Weis et al. [60]. Immediately after staining, cell suspensions were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur). MitoTracker dyes were excited using 488 air-cooled argon laser. Negative controls (samples without stain) were included for setting up the machine voltages. Controls stained with a single dye were also employed to allow the setting of compensation. The emission of fluorochromes was recorded through detectors and specific band-pass fluorescence filters: red (FL3; 670 nm long pass) and green (FL1; 530 nm/30). Fluorescence emissions were collected using logarithmic amplification. Briefly, data from 10,000 events (intact cells) were acquired and mean relative fluorescence intensity was determined after exclusion of debris events. All flow cytometric acquisitions and analyses were performed using CELLQuest Pro data acquisition (Becton–Dickinson, San Jose, CA) and FlowJo analysis software respectively. Data were analyzed and plotted by density as a single-parameter histogram that shows the relative fluorescence on the x-axis and the number of events (cell count) on the y-axis. The histograms were divided in two halves (named cells with low and high mass or potential), based on the peak of the controls for MTG and MTR, and this evaluation was extended to all data in each parameter. Using this method, analyses of cells resulted in two populations, with different mitochondrial mass and $\Delta\psi$. The first population presented low mass or $\Delta\psi$ and the second, high mass or $\Delta\psi$. The lower accumulation of MTG or MTR, and thus lower fluorescence values would be indicative of decreased mitochondrial mass or $\Delta\psi$ [61, 62].

Determination of Respiratory Chain Activity

Brain structures were freshly homogenized with a teflon—glass homogenizer (1:20, w/v) in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base), pH 7.4, for determination of respiratory chain complexes activities. The homogenates were centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C and the supernatants were immediately frozen at -70 °C and kept at this temperature until analyses. Mitochondrial energy metabolism was evaluated using enzymatic analysis of the electron transport chain (ETC)

activities. The activities of the ETC complexes I–III, II and IV were determined in homogenates according to standard methods previously described in the literature [63–65]. The activity of complex I–III (complex I + CoQ + III) was assessed by measuring the increase in absorbance due to cytochrome c reduction at 550 nm according to the method described by Schapira et al. [65]. The reaction mixture contained 5–10 μ g of protein and 20 mM potassium phosphate buffer with 2 mM KCN, 10 mM EDTA and 50 mM cytochrome c, pH 8.0. The reaction was initiated by adding 25 mM NADH and was monitored at 25 °C for 3 min before addition of 10 mM rotenone, after which the activity was measured for additional 3 min. Complex I–III activity was the rotenone sensitive NADH: cytochrome c reductase activity. The activity of complex II [succinate: 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) oxireductase] was determined according to Fischer et al. [63], following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm. The reaction medium consisting of 40 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 16.0 mM sodium succinate and 8 μ M DCIP was preincubated with 30–60 μ g protein at 30 °C for 20 min. After that, 5 mM sodium azide, 8 μ M rotenone and 50 μ M DCIP were added to the medium and monitored for 5 min. Cytochrome c oxidase (COX, complex IV) activity was determined according to Rustin et al. [64], following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm. The reaction was initiated adding 0.175 mg reduced cytochrome c in a medium containing 10 mM potassium phosphate buffer, 0.6 mM n-dodecyl- β -D-maltoside, pH 7.0 and 1.5–3 μ g protein. The activity of complex IV was measured at 25 °C for 10 min. The activity of respiratory chain complexes were calculated and expressed as nmol per min per mg of protein.

Statistical Analyses

Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA; neonatal intervention and diet as factors), with Duncan post hoc analysis when appropriate. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance levels for all measures were set at $p \leq 0.05$. *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, SPSS Inc, Chicago, IL)* version 18.0 was used for the statistical analyses.

Results

SOD Activity was assessed in hippocampus after 15 weeks of treatment with diets. The two-way ANOVA demonstrated no effects of diets [$F(1,32) = 0.080$, $p = 0.780$], neonatal intervention [handling and maternal separation,

$F(2,32) = 0.264$, $p = 0.77$] or interactions [$F(5,32) = 0.324$, $p = 0.894$] on SOD activity (Fig. 1a).

Considering glutathione peroxidase activity in hippocampus, we observed an effect of diet [two-way ANOVA, $F(1,37) = 9.444$, $p = 0.004$], since rats fed an n-3 PUFAs deficient diet displayed higher glutathione peroxidase activity compared to rats fed an n-3 PUFAs adequate diet (Fig. 1b). Additionally, two-way ANOVA revealed an interaction among diet and neonatal stress [two-way ANOVA, $F(5,37) = 2.856$, $p = 0.030$], indicating that animals fed n-3 PUFAs deficient diet showed higher increase in glutathione peroxidase activity when they had been subjected to an intervention early in life (handling or maternal separation) (Fig. 1b, Duncan post hoc test: $p < 0.05$). No group effects [two-way ANOVA, $F(2,37) = 1.031$, $p = 0.368$] were observed.

A diet effect [two-way ANOVA, $F(1,39) = 7.233$, $p = 0.011$] was observed on catalase activity, demonstrating that animals fed n-3 PUFAs deficient diet showed higher levels than animals fed n-3 PUFAs adequate diet (Fig. 1c). No group effects [$F(2,39) = 0.547$, $p = 0.584$] or interactions [$F(5,39) = 1.971$, $p = 0.108$] were observed.

No group, diet or interactions differences were observed on the ratios of SOD to glutathione peroxidase or catalase enzymatic activities in hippocampus [data not shown, $p > 0.05$].

The evaluation of free radicals production, in hippocampus, by the chemical oxidation of dichlorodihydrofluorescein (DCFH) was performed. Two-way ANOVA demonstrated a diet effect [$F(1,39) = 5.548$, $p = 0.024$], since animals fed n-3 PUFAs deficient diet showed higher DCFH production in hippocampus, compared to animals fed n-3 PUFAs adequate diet (Fig. 2a). Importantly, the results revealed an interaction among diet and neonatal stress groups [two-way ANOVA, $F(5,39) = 2.533$, $p = 0.047$], since DCF levels were increased with the deficient diet only in groups that were subjected to neonatal interventions (Fig. 2a).

Statistical analysis of total thiol content revealed a neonatal stress effect [two-way ANOVA, $F(2,37) = 5.241$, $p = 0.011$], since animals subjected to neonatal interventions displayed lower thiol content (Fig. 2b, Duncan post hoc test: $p < 0.05$). There was also a diet effect [$F(1,37) = 4.881$, $p = 0.034$], since animals fed n-3 PUFAs deficient diet showed higher thiol content than animals fed n-3 PUFAs adequate diet. Additionally, interactions among diet and neonatal stress were observed [two-way ANOVA, $F(5,37) = 4.868$, $p = 0.002$], since the deficient diet-induced increase in thiol content was higher in handled and maternal separated animals (Fig. 2b).

Considering mitochondrial mass, statistical analysis showed no effects of neonatal interventions, diet or

interactions [two-way ANOVA, $p > 0.05$, data not shown]. On the other hand, neonatal intervention showed a significant effect on mitochondrial membrane potential (Fig. 3a, c) [two-way ANOVA, $F(2,39) = 3.347$, $p = 0.047$], reducing this parameter, especially on handled animals. No effects of diet or interactions were observed ($p > 0.05$).

Mitochondrial respiratory chain activities were determined in hippocampus of male rats after chronic (15 weeks) treatment of n-3 PUFAs adequate or deficient diet. Hippocampal complexes I-III, II and IV activities demonstrated no significant differences among all experimental groups ($p > 0.05$, data not shown).

Discussion

We hypothesized that neonatal stress and exposure to a dietary n-3 PUFAs deficiency later in life could interact to produce alterations on hippocampal mitochondrial function and oxidative stress parameters. We observed interactions between these factors, in such a way that a chronic treatment with deficient n-3 PUFAs diet increased antioxidant enzymes activities (glutathione peroxidase and catalase), free radicals production and thiol content, when compared to adequate n-3 PUFAs diet treatment, with these increases observed mainly in animals that had been subjected to neonatal stress interventions. Additionally, reduced mitochondrial potential was observed in animals subjected to neonatal interventions, specially in animals handled in the neonatal period.

When analyzing these results, it is important to emphasize the distinct n-6:n-3 ratio of PUFAs content in these different dietary treatments (adequate: 2:1 ratio, deficient: 6:1 ratio). Pathways related to n-3 PUFAs are anti-inflammatory while those involving n-6 PUFAs are pro-inflammatory [66]. Both series of PUFAs compete with each other for the same enzymes [67, 68]. In this sense, a balanced n-6:n-3 ratio is necessary for metabolic homeostasis. Although our n-3 PUFAs deficient diet exhibits only a mild deficiency in n-3 PUFAs, this intervention was able to increase, in hippocampus, glutathione peroxidase and catalase activities. SOD levels remained unchanged in all experimental groups and the ratios SOD/GPx and SOD/CAT were not altered. Another important data observed in this study was the higher thiol levels in hippocampus, induced by n-3 PUFAs deficiency. Thiol content correlates inversely to the oxidative damage to proteins. This evaluation also includes the levels of reduced glutathione, therefore it is also possible that the cell increased the production of this peptide in order to adjust to GPx increased activity, since it is used by that enzyme as a hydrogen donor. Although we did not measure oxidative damage, the results observed in the present study could

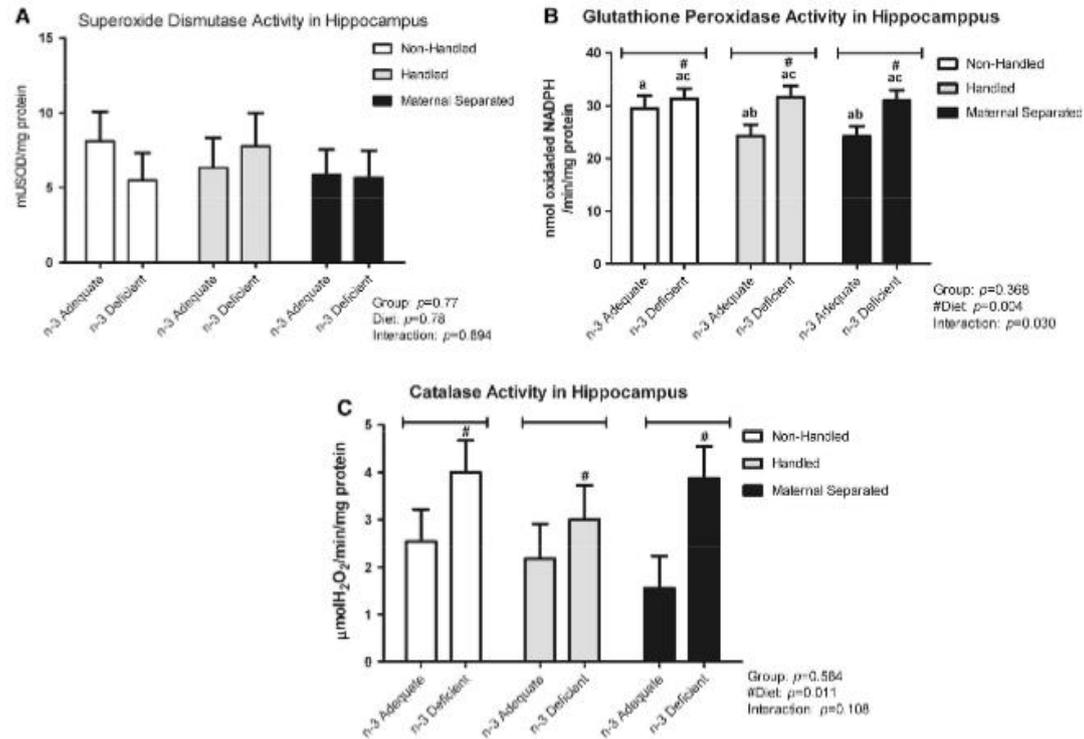


Fig. 1 SOD, glutathione peroxidase and catalase activity in hippocampus after chronic (15 weeks) treatment with n-3 PUFAs adequate or deficient diets. Data expressed as mean + SEM of 5–7 animals/group. **a** The two-way ANOVA demonstrated no effects of diets, neonatal interventions (handling or maternal separation) or interactions among all factors on hippocampus SOD activity (two-way ANOVA, $p > 0.05$). **b** Two-way ANOVA demonstrated a diet effect [$^{\#}$, two way ANOVA, $F(1,37) = 9.444$, $p = 0.004$], and an

interaction among diets and neonatal stress groups [$F(5,37) = 2.856$, $p = 0.030$] in hippocampus glutathione peroxidase activity. No group effects were observed. Different letters indicate statistical differences (Duncan post hoc test; $p < 0.05$). **c** Two-way ANOVA demonstrated a diet effect [$^{\#}$, two way ANOVA, $F(1,39) = 7.233$, $p = 0.011$], and no group effects or interactions (two-way ANOVA, $p > 0.05$) on hippocampus catalase activity

suggest an altered susceptibility to oxidative stress. It is possible that the observed increase in antioxidant enzymes might be a hippocampal response, an attempt to compensate for the increased free radicals production, also enlarged by n-3 PUFAs deficiency, trying to prevent cellular proteins, DNA and lipids damage.

Interactions between neonatal interventions and diet were observed on several of the parameters related to oxidative imbalance. It is interesting to observe the similar profiles of ROS production, GPx activity and total thiol content among neonatal stress groups receiving adequate or deficient n-3 diets. It is possible to speculate that these parameters are related in their responses, and the amount of ROS production may be reflected on GPx activity and on thiol content (particularly glutathione; see [69], since it would be necessary to GPx action). MS animals had lower ROS production, and thiol content. It is difficult to

determine at this time if this lower set point would be favorable or not, since some ROS production is important for different cellular functions, including metabolic reactions and cellular signaling [70].

A recent study was able to demonstrate that a trans-generational n-3 PUFAs deficiency increased lipid peroxidation, SOD and catalase activity in *striatum* and *substantia nigra* in different ways, even in different generations and development stages [71]. Taken together, our results concerning the effects of n-3 PUFAs deficiency in hippocampus shows the importance of this dietary content to maintain an effective redox balance in this structure. These results reinforce the hypothesis that n-3 PUFAs dietary deficiency might increase the risk of certain neurological, mood or memory impairments, since hippocampus plays a key role in these functions and oxidative stress has been implicated in those disturbances [72].

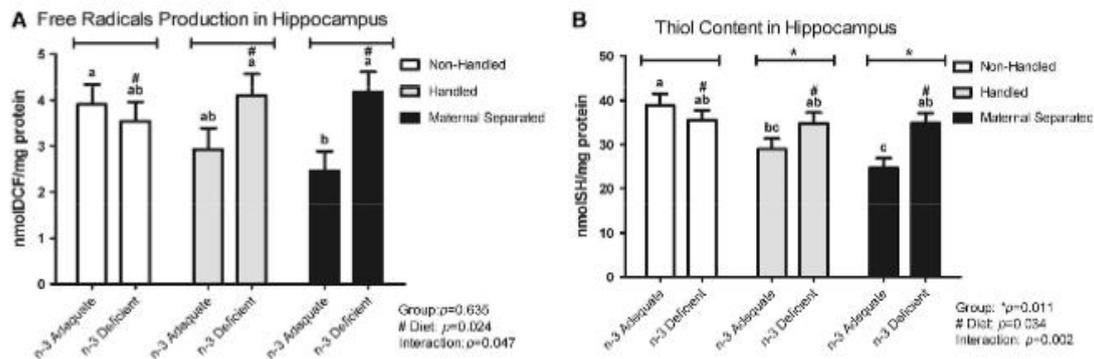


Fig. 2 Free radicals production and thiol content in hippocampus were determined after chronic (15 weeks) treatment with n-3 PUFAs adequate or deficient diet. Data expressed as mean \pm SEM of 5–7 animals/group. **a** Two-way ANOVA demonstrated a diet effect [$F(1,39) = 5.548, p = 0.024$], and an interaction among diets and neonatal stress groups [$F(5,39) = 2.533, p = 0.047$] on hippocampus free radicals production. No group effects were observed ($p < 0.05$). Different letters indicate statistical differences (Duncan post hoc test;

$p < 0.05$). **b** Two-way ANOVA demonstrated a diet effect [$*, F(1,37) = 4.881, p = 0.0034$], and a neonatal stress intervention effect [$*, F(2,37) = 5.241, p = 0.011$], as well as an interaction among diets and neonatal stress groups [$F(5,37) = 4.868, p = 0.002$] on hippocampus thiol content (Duncan post hoc test: $p < 0.05$). Different letters indicate a statistical interaction difference among diets and neonatal stress groups (Two-way ANOVA, $p < 0.05$)

Neonatal interventions groups showed decreased mitochondrial membrane potential compared to intact animals (NH), and this effect was particularly prominent in handled animals. This result might be related to an early apoptosis characteristic, maybe induced by oxidative damage. Noschag et al. [50] reported that neonatal handled male rats display, when adults, higher DNA break levels in hippocampus, what could be due to oxidative imbalance. Another focus to consider are the possible epigenetics and post translational modifications involved in these processes. Perhaps the findings observed in the present study might also imply that our deficient diet was able to significantly alter the machinery of antioxidant enzymes. Our group and others have already demonstrated that neonatal handling leads to differences in adolescent and adult rats on neurochemical and behavioral parameters [50–54, 73]. We also demonstrated that H and MS, exposed chronically to n-3 PUFAs deficiency, displayed lower brain derived neurotrophic factor protein in hippocampus (BDNF) [20]. Together, the BDNF reduction, oxidative imbalance, and reduced mitochondrial potential suggest mitochondrial involvement in hippocampal modulation of neuroprotection and/or injury in neonatal stressed animals. More studies are necessary to elucidate possible involvements of epigenetics and mitochondrial biochemical machineries as a vulnerability factor of neonatal stressed animals.

Additionally, no effects of diet or neonatal interventions were observed on the activities of respiratory chain complexes. Therefore, the reduced mitochondrial potential observed in handled animals could be related to other mechanisms, such as uncoupling proteins [74, 75]. Taken together, these results could suggest that animals subjected

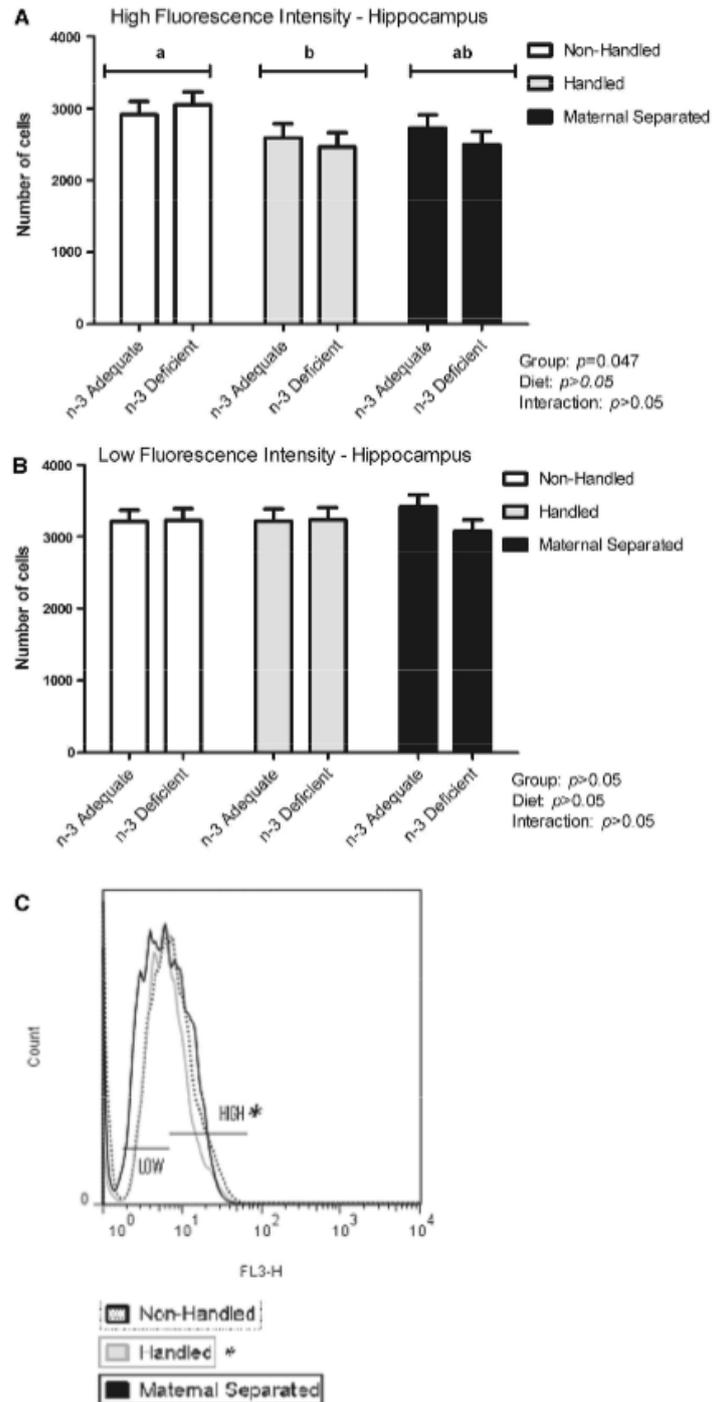
to neonatal interventions such as those used in the present study exhibit a higher susceptibility to energetic demands in hippocampus, and are more affected by deficiencies in their diets, that could lead to oxidative imbalance in hippocampus, such as an exposure to a n-3 deficient diet from the puberty period.

More studies are necessary to elucidate possible mechanisms involved in these processes. Despite the statistically significant reduction in the number of cells with high potential, the fact that no difference was observed in numbers of low-potential cells, and the lack of changes in mitochondrial complexes activities raises concerns about the real biological significant of this result. Therefore, it is also possible that mitochondrial function is not significantly affected. However, this reduction in cells with high potential could lead to cells less able to respond to higher energy demands. Another point to be considered is whether these modifications are permanent or not, i.e., if the access to an adequate diet would reverse the oxidative imbalance observed. This question remains to be answered.

Conclusions

In conclusion, we observed that a chronic treatment with deficient n-3 PUFAs diet from the puberty period causes an increase in free radicals production and an imbalance in antioxidant enzymes activities, compared to and adequate n-3 PUFAs diet treatment, and these increases were observed mainly in animals that had been subjected to neonatal interventions.

Fig. 3 Mitochondrial membrane potential and mass measurement in hippocampus after chronic treatment (15 weeks) with n-3 PUFAs adequate or deficient diets. Data were expressed as mean relative number of cells (mean \pm SEM) of 6–7 animals/group and plotted as a histogram producing two populations (with high and low mitochondrial potential). **a** A two-way ANOVA showed a neonatal stress effect [$F(2,39) = 3.347$, $p = 0.047$], since handled animals displayed, in hippocampus, lower mitochondrial potential when compared to other experimental groups. No diet effects or interactions ($p > 0.05$) were observed. *Different letters* indicate statistical differences (two-way ANOVA, $p = 0.047$). **b** No neonatal stress, diet or interactions effects ($p > 0.05$) were found in hippocampus mitochondrial mass measurements. **c** Flow cytometry histogram for mitochondrial mass in hippocampus after chronic treatment (15 weeks) with n-3 PUFAs adequate or deficient diets ($p = 0.047$)



Acknowledgments This work was supported by grants from PRONEX FAPERGS/CNPq 10/0018.3 and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)—Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Brazil), the National Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) and the National Council for Scientific and Technological Development, INCT Translacional Medicine (CNPq) 573671/2008.7. (CNPq, Brazil).

Author Contributions All authors listed above participated in the study to a significant extent. Charles Francisco Ferreira, Juliana Romaldi Bernardi, Rachel Krolow, Leticia Pettenuzzo, Patricia Pelufo Silveira and Carla Dalmaz worked on analysis and interpretation of data, writing and intellectual content of the article. Charles Francisco Ferreira, Juliana Romaldi Bernardi, Diego Carrilho da Silva, Natividade de Sá Couto-Pereira, Carina de Souza Mota, Simone Nardin Weis, Rachel Krolow, Leticia Pettenuzzo, Patricia Pelufo Silveira and Carla Dalmaz worked on the conception, design and data collection. All authors read and approved the submitted manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest Charles Francisco Ferreira receives a PhD CAPES scholarship and declares no potential conflicts of interest. Carina de Souza Mota and Natividade de Sá Couto Pereira receive PhD CNPq scholarship and declare no potential conflicts of interest. Leticia Pettenuzzo, Rachel Krolow and Simone Nardin Weis receive post-doctoral scholarship and declare no potential conflicts of interest. Juliana Romaldi Bernardi and Diego Carrilho da Silva declare no potential conflicts of interest. Patricia Pelufo Silveira and Carla Dalmaz receive research support from Brazilian government institutions (CNPQ, FAPERGS and FIPE-HCPA) and declare no potential conflicts of interest.

References

- Svennerholm L (1968) Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res* 9:570–579
- Bourre JM (2004) Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J Nutr Health Aging* 8:163–174
- Sinclair AJ (1975) Long-chain polyunsaturated fatty acids in the mammalian brain. *Proc Nutr Soc* 34:287–291
- Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D (1998) Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry* 43:315–319
- Simopoulos AP, Leaf A, Salem N (1999) Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *J Am Coll Nutr* 18:487–489
- Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Poumès-Ballihaut C, Charpeil-Potokar G, Lavalie M (2004) Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev* 44:509–538
- Muldoon MF, Ryan CM, Sheu L, Yao JK, Conklin SM, Manuck SB (2010) Serum phospholipid docosahexaenoic acid is associated with cognitive functioning during middle adulthood. *J Nutr* 140:848–853
- Aid S, Vancassel S, Poumès-Ballihaut C, Chalou S, Guesnet P, Lavalie M (2003) Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J Lipid Res* 44:1545–1551
- Bourre JM, Francois M, Youyou A, Dumont O, Piciotti M, Pascal G, Durand G (1989) The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr* 119:1880–1892
- Moriguchi T, Greiner RS, Salem N (2000) Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem* 75:2563–2573
- Bourre JM (2006) Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 1: micronutrients. *J Nutr Health Aging* 10:377–385
- Mazza M, Pomponi M, Janiri L, Brija P, Mazza S (2007) Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:12–26
- Litman BJ, Mitchell DC (1996) A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids* 31(Suppl):S193–S197
- Kitajka K, Puskás LG, Zvara A, Hackler L, Barceló Coblijn G, Yeo YK, Farkas T (2002) The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2619–2624
- Yehuda S, Rabinovitz S, Mostrofsky DI (1999) Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *J Neurosci Res* 56:565–570
- Sakamoto T, Causev M, Wurtman RJ (2007) Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res* 1182:50–59
- Fedorova I, Hussein N, Di Martino C, Moriguchi T, Hoshiba J, Majchrzak S, Salem N (2007) An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77:269–277
- Kawakita E, Hashimoto M, Shido O (2006) Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* 139:991–997
- Beltz BS, Tlustý MF, Benton JL, Sandeman DC (2007) Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neurosci Lett* 415:154–158
- Ferreira CF, Bernardi JR, Krolow R, Arcego DM, Fries GR, de Aguiar BW, Senter G, Kapezinski FP, Silveira PP, Dalmaz C (2013) Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 107:11–19
- Das UN (2013) Autism as a disorder of deficiency of brain-derived neurotrophic factor and altered metabolism of polyunsaturated fatty acids. *Nutrition* 29:1175–1185
- Catalan J, Moriguchi T, Slotnick B, Murthy M, Greiner RS, Salem N (2002) Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* 116:1022–1031
- Fedorova I, Salem N Jr (2006) Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:271–289
- Feng Z, Zou X, Jia H, Li X, Zhu Z, Liu X, Bucheli P, Balleve O, Hou Y, Zhang W et al (2012) Maternal docosahexaenoic acid feeding protects against impairment of learning and memory and oxidative stress in prenatally stressed rats: possible role of neuronal mitochondria metabolism. *Antioxid Redox Signal* 16:275–289
- Bazan NG (2009) Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 81:205–211
- Bazan NG (2009) Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 50(Suppl):S400–S405
- Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S (2013) n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. *Curr Med Chem* 20:2953–2963

28. Nakamura MT, Yudell BF, Looer JJ (2013) Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 53C:124–144
29. Yeh YY, Gehman MF, Yeh SM (1993) Maternal dietary fish oil enriches docosahexaenoate levels in brain subcellular fractions of offspring. *J Neurosci Res* 35:218–226
30. Reddy RD, Yao JK (1996) Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55:33–43
31. Brenna JT, Diau GY (2007) The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77:247–250
32. Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2:342–352
33. DiMauro S, Schon EA (2008) Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:91–123
34. Harper MF, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, Ramsey JJ (2004) Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiol Scand* 182:321–331
35. Arnold S (2012) Cytochrome c oxidase and its role in neurodegeneration and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 748:305–339
36. Hsieh HL, Yang CM (2013) Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int* 2013:484613
37. Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC (2007) Frontiers in neuroscience oxidative stress and the aging brain: from theory to prevention. In: Riddle DR (ed) *Brain aging: models, methods, and mechanisms*. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton
38. Hroudová J (2013) Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Neural Regen Res* 8:13
39. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4:118–126
40. Fukui T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15:1583–1606
41. Müller WE, Eckert A, Kurz C, Eckert GP, Leuner K (2010) Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease therapeutic aspects. *Mol Neurobiol* 41:159–171
42. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184:1155–1160
43. Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS (2006) The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 12:2249–2270
44. Martin LJ (2012) Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107:355–415
45. Sánchez MM, Ladd CO, Plotsky PM (2001) Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol* 13:419–449
46. Levine S (1957) Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 126:405
47. Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, Sarricau A (1991) The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 16:85–103
48. Gutman DA, Nemeroff CB (2002) Neurobiology of early life stress: rodent studies. *Semin Clin Neuropsychiatry* 7:89–95
49. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W (2013) Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. *Gen Comp Endocrinol* 181:306–309
50. Noschang CG, Krolow R, Fontella FU, Arcego DM, Diehl LA, Weis SN, Arteni NS, Dalmaz C (2010) Neonatal handling impairs spatial memory and leads to altered nitric oxide production and DNA breaks in a sex specific manner. *Neurochem Res* 35:1083–1091
51. Noschang C, Krolow R, Arcego DM, Toniazzi AP, Huffell AP, Dalmaz C (2012) Neonatal handling affects learning, reversal learning and antioxidant enzymes activities in a sex-specific manner in rats. *Int J Dev Neurosci* 30:285–291
52. Noschang C, Krolow R, Arcego DM, Laureano D, Firarelli LD, Huffell AP, Ferreira AG, da Cunha AA, Machado FR, Wyse AT, Dalmaz C (2012) The influence of early life interventions on olfactory memory related to palatable food, and on oxidative stress parameters and Na⁺/K⁺ -ATPase activity in the hippocampus and olfactory bulb of female adult rats. *Neurochem Res* 37:1801–1810
53. de Lima Marcolin M, André de Noronha DB, Arcego DM, Noschang C, Krolow R, Dalmaz C (2012) Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiology and behavior* 106(4):491–498
54. Diehl LA, Alvares LO, Noschang C, Engelke D, Andreazza AC, Gonçalves CA, Quillfeldt JA, Dalmaz C (2012) Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: effects on memory and hippocampal oxidative stress. *Neurochem Res* 37:700–707
55. Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Dumon MF, Receveur MC, Le Bras M, Clerc M (1995) Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem* 28:163–169
56. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–333
57. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
58. Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V (1997) Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res* 749:44–52
59. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145
60. Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS, Dalmaz C, Wyse AT, Netto CA (2012) Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 12:271–279
61. Khanal G, Chung K, Solis-Wever X, Johnson B, Pappas D (2011) Ischemia/reperfusion injury of primary porcine cardiomyocytes in a low shear microfluidic culture and analysis device. *Analyst* 136:3519–3526
62. Rodriguez-Enriquez S, Kai Y, Maldonado E, Currin RT, Lemasters JJ (2009) Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes. *Autophagy* 5:1099–1106
63. Fischer JC, Ruitenbeck W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23–36
64. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51
65. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823–827

66. Bagga D, Wang L, Farias-Hisner R, Glaspy JA, Reddy ST (2003) Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1751–1756
67. Schmitz G, Ecker J (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47:147–155
68. Ooi EM, Ng TW, Watts GF, Barrett PH (2013) Dietary fatty acids and lipoprotein metabolism: new insights and updates. *Curr Opin Lipidol* 24:192–197
69. Itoh K, Ye P, Matsumiya T, Tanji K, Ozaki T (2015) Emerging functional cross-talk between the Kcap1-Nrf2 system and mitochondria. *J Clin Biochem Nutr* 56:91–97
70. Ladelfa MF, Toledo MF, Laiseca JE, Monte M (2011) Interaction of p53 with tumor suppressive and oncogenic signaling pathways to control cellular reactive oxygen species production. *Antioxid Redox Signal* 15:1749–1761
71. Cardoso HD, Passos PP, Lagranha CJ, Ferraz AC, Santos Júnior EF, Oliveira RS, Oliveira PE, ReC Santos, Santana DF, Borba JM et al (2012) Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. *Front Hum Neurosci* 6:249
72. Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF (2014) Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Front Mol Neurosci* 7:24
73. Park MK, Hoang TA, Belluzzi JD, Leslie FM (2003) Gender specific effect of neonatal handling on stress reactivity of adolescent rats. *J Neuroendocrinol* 15:289–295
74. Liu Y, Chen L, Xu X, Vicaut E, Sercombe R (2009) Both ischemic preconditioning and ghrelin administration protect hippocampus from ischemia/reperfusion and upregulate uncoupling protein-2. *BMC Physiol* 9:17
75. Diano S, Matthews RT, Patrylo P, Yang L, Beal MF, Barnstable CJ, Horvath TL (2003) Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. *Endocrinology* 144:5014–5021

1.3. CAPÍTULO 3

Correlation between n-3 polyunsaturated fatty acids consumption and BDNF peripheral levels in adolescents.

Short Report publicado na Revista Lipids in Health and Disease.

SHORT REPORT

Open Access

Correlation between n-3 polyunsaturated fatty acids consumption and BDNF peripheral levels in adolescents

Charles Francisco Ferreira^{1,2,3,6*}, Juliana Rombaldi Bernardi³, Vera Lúcia Bosa³, Ilaine Schuch³, Marcelo Zubaran Goldani³, Flávio Kapczynski⁵, Giovanni Abrahão Salum⁴, Carla Dalmaz^{1,2}, Gisele Gus Manfro^{1,4} and Patrícia Pelúfo Silveira¹

Abstract

Background: Although several studies have reported an association between mental disorders and serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), this association is still poorly understood. The study of factors associated with both BDNF levels and mental disorders, such as n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs), may help to elucidate the mechanisms mediating the relationship between the two variables. Therefore, the present study aimed to evaluate whether the intake n-3 PUFAs correlates with serum levels of BDNF.

Findings: This study involved 137 adolescents drawn from a community sample, including a group with high levels of anxiety, assessed using the Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders. Blood samples were collected and serum BDNF levels were measured. n-3 PUFAs were estimated using a food frequency questionnaire for adolescents. Correlations were performed to assess the association between n-3 PUFAs intake and BDNF levels. Effects of potential confounders (total fat consumption, age, gender and anxiety) were examined using linear regression models. There was a direct correlation between n-3 PUFAs consumption and serum BDNF levels, which remained significant even after accounting for potential confounders.

Conclusions: We were able to detect a correlation between n-3 PUFAs intake and peripheral BDNF levels. Our study was limited by its small sample size, and our external validity may be restricted by the oversampling of anxious adolescents. Our findings may help determine the nature of the association between mental disorders and serum levels of BDNF. However, more studies are needed to elucidate the possible mechanisms by which n-3 PUFAs intake affects BDNF levels, and how this may lead to an increased vulnerability to psychiatric disorders.

Keywords: Anxiety, Children, Adolescents, SCARED, BDNF

Background

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a dimeric protein thought to be involved in neuronal survival and synaptic plasticity, and to be an important biomarker for psychiatric conditions such as depression and bipolar disorder [1-3]. It is a member of the growth factor family and acts as a regulator of synaptic plasticity, synaptogenesis, as well as neuronal survival and differentiation [4-6]. Therefore, the understanding of processes associated with both

BDNF levels and mental disorders may ultimately help determine the underlying mechanisms responsible for the association between these two variables.

Studies of human subjects have demonstrated that lower per capita fish/seafood consumption, which can be used as a surrogate measurement of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) dietary intake, is associated with a higher prevalence of bipolar spectrum disorders [7,8], major depression [9,10] and postpartum depression [11,12]. Experimental studies in rats demonstrate that polyunsaturated fatty acids (PUFAs) could modify brain BDNF levels [13-15] and may play an important role in the function and structure of many membrane proteins [16,17]. Nevertheless, there is still a need to investigate whether the

* Correspondence: neurocientista@hotmail.com

¹Post Graduate Program in Neuroscience, Institute of Basic Sciences/Health, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratory of Stress Neurobiology, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



relationship between dietary n-3 PUFAs intake and BDNF translates to humans. In light of these above findings, the aim of the present study was to evaluate whether the consumption of n-3 PUFAs correlates with serum BDNF levels in humans.

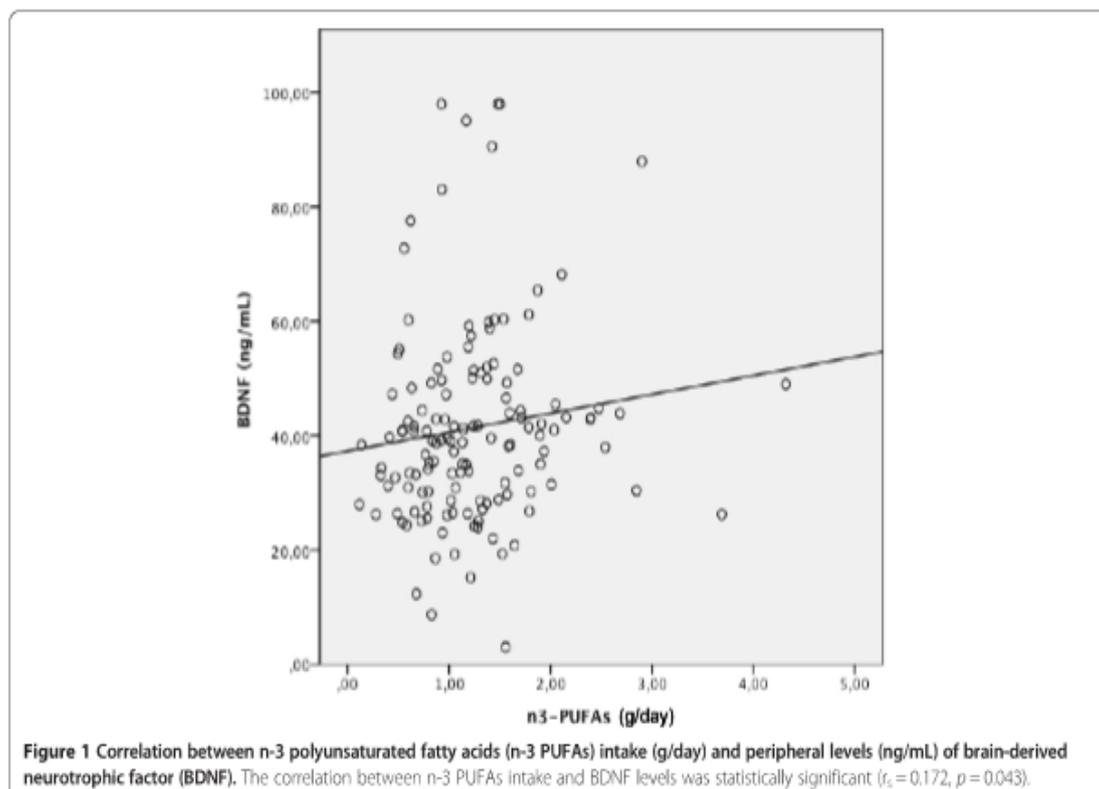
Findings

The current study involved 137 adolescents drawn from a community sample, including a group with high rates of anxiety (64.6% female; mean age 13.9 years, SD = 2.42), as assessed by the Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) [18]. A detailed description of the sampling process can be found elsewhere [19]. Briefly, all quartiles of the distribution of SCARED scores were equally represented in the sample (i.e., no to very low anxiety, mild anxiety, moderate anxiety and severe anxiety), although there was an oversampling of participants in the upper quartile (severe anxiety). The SCARED inventory comprises 38 items that can be grouped into subscales according to the different anxiety symptoms investigated, and consists of a screening tool for DMS-IV childhood anxiety disorder. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, protocol number 08–481). Informed consent was provided by all

primary caretakers, and all adolescents assented to participate in the study.

Blood samples were collected between 7 and 10 am after a fasting period of 10–12 hours, centrifuged for 5 minutes at 4500 rpm, and serum was stored at -80°C in order to measure BDNF levels. All BDNF measurements were performed on the same day by sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for BDNF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota), according to the manufacturer's instructions. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.7 and 8.5%, respectively. n-3 PUFAs intake was estimated by a food frequency questionnaire administered to the adolescents (FFQ) [20]. The quantitative analysis of macro and micronutrient intake was performed using the NutriBase[®] software (Version NB7 Network) [Phoenix, AZ, USD]. Spearman correlations were performed to assess the association between n-3 PUFA intake and BDNF levels. The effects of potential confounders (total fat intake, age, gender and symptoms of anxiety) were examined using linear regression models (involving log-transformed BDNF values, logBDNF).

The correlation between n-3 PUFA intake and BDNF levels was statistically significant, $r_s = 0.172$, $p = 0.043$ (Figure 1). Multivariate linear regression models showed that even after controlling for the confounders, n-3 PUFA intake was associated with higher levels of logBDNF



(beta = .463, $t = 2.83$, $p = 0.005$). No evidence of collinearity was found in the model.

Discussion

We were able to show that n-3 PUFAs intake is associated with serum BDNF levels in adolescents, corroborating to the suggestion that the relationship between mental disorders and BDNF may be mediated by the intake of nutrients such as n-3 PUFAs. This may influence the cellular and physiological processes involved in psychiatric/mood disorders, such as the fatty acid composition of cellular membranes, the modulation of behavioral systems, neurodevelopment, and oxidative stress in specific brain areas [21-25].

Studies suggest that n-3 PUFA-depleted rodents exhibit changes in emotional status such as elevated aggression, depression and anxiety [26-31]. Moreover, the dietary deprivation of n-3 PUFAs in rats may lead to changes in the expression of BDNF in the frontal cortex, in cAMP response element binding protein (CREB) activity and reduce p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity [13].

It is noteworthy that the food frequency questionnaire used in the study contained a varied list of 94 foods or drinks [20,32]. Thus, the corresponding food sources to the n-3 PUFAs consumption among students were diverse, including vegetable oils and products/preparations based in oils (e.g. biscuits, mayonnaise and fried foods), according to calculations performed with the values depicted in the American Food Table [33]. Besides fish and oils consumption, red meat is also considered a source of n-3 PUFAs [34], and our region is especially known to have a high consumption of meat. A national survey conducted in both urban and rural areas throughout the country with analysis of individual food consumption in Brazil from 2008–2009 [35], reported that the Southern region of Brazil, including the State of Rio Grande do Sul, where the city Porto Alegre lays, was identified as one of the leading regions in the consumption of red or pork meat. Besides, it was also observed that among 10 to 13 years old population, the n-3 PUFAs displayed a high daily consumption (mean: 1.5 g) in this region, compared to other Brazilian regions. Meat intake is traditionally high and typical from our region, which could probably corroborate to the high n-3 PUFAs consumption levels evidenced in this study.

It is important to note that our study is limited by its small sample size, and that the oversampling of anxious adolescents may restrict our external validity. However, in spite of these limitations, we were able to detect a correlation between n-3 PUFAs consumption and serum BDNF levels. The extent to which peripheral BDNF levels are representative of central nervous system BDNF levels remains to be investigated, although positive correlations

between serum and cortical BDNF levels have been reported in preclinical studies [36], and cellular and behavioral brain functions have been found to be modulated by peripheral BDNF [37]. Furthermore, serum BDNF levels have been associated with neuronal integrity in healthy subjects [38] and decreased BDNF peripheral levels (i.e. serum or plasma) have been consistently found in patients with mood disorders [39,40]. BDNF is implicated in a variety of neural processes and is related to neuronal developmental stages in both animals and humans [39]. Lang, Hellweg, Sseifert, Schubert and Gallinat, 2007 [38] reported that serum BDNF protein concentration might reflect some aspects of neuronal plasticity in the living human brain, playing a role as regulators of neuronal survival and differentiation. Similar findings have been reported by Poo, 2001 [6]. Recent studies demonstrate that decreased peripheral BDNF levels are consistently related to disease activity and progression in bipolar disorder [41] as well as to the cognitive impairment seen in patients following their first psychotic episode [42]. More studies are needed to elucidate the possible mechanisms by which n-3 PUFAs consumption affects BDNF levels and influences the vulnerability to psychiatric and mood disorders, especially during certain life stages such as adolescence.

Abbreviations

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; DMS IV: Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; n-3 PUFAs: Omega-3 polyunsaturated fatty acids; PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; Rpm: Revolutions per minute; SCARED scale: Screen for children and anxiety related emotional disorders scale.

Competing interest

Charles Francisco Ferreira is a CAPES scholarship recipient and declares no potential conflicts of interest. Giovanni Abrahão Salum has a CAPES/FAPERGS post-doctoral scholarship and declares no potential conflicts of interest. Vera Lúcia Bosa and Ilaine Schuch declare no potential conflicts of interest. Flávio Kapczinski, Patrícia Peluso Silveira, Carla Dalmaiz, Gisele Gus Manfro and Marcelo Zubaran Goldani have received research grants from Brazilian government institutions (CNPQ, FAPERGS and FINEP-HCPA).

Authors' contributions

All authors participated in the study to a significant extent. CFF, JRB, GAS, CD, GGM, PPS worked on data analysis and interpretation, in writing the manuscript and contributed to the intellectual content of the article. VLB, IS, MZG, FK, GAS, GGM and PPS worked on study conception and design, as well as data collection and interpretation, and made intellectual contributions to the article. All authors read and approved the submitted manuscript.

Acknowledgments

We thank the children and families for their participation. Without them, this research would not have been possible. We also thank the research teams of the *Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição Escolar* (CECANE – UFRGS) and the *Fundo Nacional para o Desenvolvimento da Educação do Ministério da Educação* (FNDE).

Role of funding source

CNPq, FINEP-HCPA and FAPERGS provided the funding for the clinicians and interviewers involved in the study, and for the purchase of all necessary materials. CAPES (CFF and GAS), FAPERGS (GAS) and CNPq (FK, PPS, CD, GGM, MZG) provided scholarships to the researchers. No funding agencies participated in the execution of the present study, including data collection, analysis and manuscript preparation.

Author details

¹Post Graduate Program in Neuroscience, Institute of Basic Sciences/Health, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²Laboratory of Stress Neurobiology, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ³Center for Child and Adolescent Health Studies (NESCA), Translational Pediatrics Laboratory (LPT), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴Anxiety Disorders Outpatient Program for Children and Adolescents, National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents (INPD, CNPq), Graduate Program in Medical Sciences: Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁵Laboratory of Molecular Psychiatry, Psychiatry Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁶Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo, Departamento de Bioquímica, UFRGS, CEP 90035-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Received: 13 December 2013 Accepted: 20 February 2014
Published: 5 March 2014

References

- Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M: **Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants.** *Biol Psychiatry* 2003, **54**:70-75.
- Kapczinski F, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M, Grassi-Oliveira R: **Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder.** *Expert Rev Neurother* 2008, **8**:1101-1113.
- Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN: **Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2009, **12**:447-458.
- Park H, Poo MM: **Neurotrophin regulation of neural circuit development and function.** *Nat Rev Neurosci* 2013, **14**:7-23.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS: **The cellular neurobiology of depression.** *Nat Med* 2001, **7**:541-547.
- Poo MM: **Neurotrophins as synaptic modulators.** *Nat Rev Neurosci* 2001, **2**:24-32.
- Noaghiul S, Hibbeln JR: **Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders.** *Am J Psychiatry* 2003, **160**:2222-2227.
- McNamara RK: **Evaluation of docosahexaenoic acid deficiency as a preventable risk factor for recurrent affective disorders: current status, future directions, and dietary recommendations.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009, **81**:223-231.
- Hibbeln JR: **Fish consumption and major depression.** *Lancet* 1998, **351**:1213.
- De Vries SR, Christophe AB, Maes M: **Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression.** *Life Sci* 2003, **73**:3181-3187.
- Shapiro GD, Fraser WD, Séguin JR: **Emerging risk factors for postpartum depression: serotonin transporter genotype and omega-3 fatty acid status.** *Can J Psychiatry* 2012, **57**:704-712.
- da Rocha CM, Kac G: **High dietary ratio of omega-6 to omega-3 polyunsaturated acids during pregnancy and prevalence of post-partum depression.** *Matern Child Nutr* 2012, **8**:36-48.
- Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC, Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP: **n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism.** *Mol Psychiatry* 2007, **12**:36-46.
- Vetrivel U, Ravichandran SB, Kuppan K, Mohanlal J, Das UN, Narayanasamy A: **Agonistic effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and its metabolites on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through molecular docking simulation.** *Lipids Health Dis* 2012, **11**:109.
- Ferreira CF, Bernardi JR, Krolow R, Arcego DM, Fries GR, de Aguiar BW, Senter G, Kapczinski FP, Silveira PP, Dalmaz C: **Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress in rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 2013, **107**:11-19.
- Youdim KA, Martin A, Joseph JA: **Essential fatty acids and the brain: possible health implications.** *Int J Dev Neurosci* 2000, **18**:383-399.
- Spector AA, Yorek MA: **Membrane lipid composition and cellular function.** *J Lipid Res* 1985, **26**:1015-1035.
- Isolan L, Salum GA, Osowski AT, Amaro E, Manfro GG: **Psychometric properties of the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) in Brazilian children and adolescents.** *J Anxiety Disord* 2011, **25**:741-748.
- Salum GA, Isolan LR, Bosa VL, Tocchetto AG, Teche SP, Schuch I, Costa JR, Costa Mde A, Jarros RB, Mansur MA, Knijnik D, Silva EA, Kieling C, Oliveira MH, Medeiros E, Bortoluzzi A, Toazza R, Blaya C, Leistner-Segal S, Salles JF, Silveira PP, Goldani MZ, Heldt E, Manfro GG: **The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings.** *Rev Bras Psiquiatr* 2011, **33**:181-195.
- Willett WC: *Nutritional Epidemiology.* Oxford: Oxford University Press; 1998.
- Balanzá-Martínez V, Fries GR, Colpo GD, Silveira PP, Pontella AK, Tabarés-Seisdedos R, Kapczinski F: **Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder.** *Expert Rev Neurother* 2011, **11**:1029-1047.
- Liperoti R, Landi F, Fusco O, Bernabei R, Onder G: **Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence.** *Curr Pharm Des* 2009, **15**:4165-4172.
- Rombaldi Bernardi J, de Souza ER, Ferreira CF, Pelúfo Silveira P: **Fetal and neonatal levels of omega-3: effects on neurodevelopment, nutrition, and growth.** *ScientificWorldJournal* 2012, **2012**:202473.
- Tur JA, Bibiloni MM, Sureda A, Pons A: **Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits.** *Br J Nutr* 2012, **107**(Suppl 2):S23-S52.
- Williams LL, Kiecolt-Glaser JK, Horrocks LA, Hillhouse JT, Glaser R: **Quantitative association between altered plasma esterified omega-6 fatty acid proportions and psychological stress.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992, **47**:165-170.
- Zimmer L, Hembert S, Durand G, Breton P, Guilloreau D, Besnard JC, Chalon S: **Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study.** *Neurosci Lett* 1998, **240**:177-181.
- Fedorova I, Salem N Jr: **Omega-3 fatty acids and rodent behavior.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006, **75**:271-289.
- Zimmer L, Delon-Vancassel S, Durand G, Guilloreau D, Bodard S, Besnard JC, Chalon S: **Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids.** *J Lipid Res* 2000, **41**:32-40.
- Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloreau D, Durand G, Chalon S: **The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids.** *Am J Clin Nutr* 2002, **75**:662-667.
- Mathieu G, Oualian C, Denis I, Lavielle M, Gisquet-Verrier P, Vancassel S: **Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation together with early maternal separation increases anxiety and vulnerability to stress in adult rats.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011, **85**:129-136.
- Mathieu G, Denis S, Lavielle M, Vancassel S: **Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008, **78**:391-401.
- Slater B, Philippi ST, Fisberg RM, Latorre MR: **Validation of a semi-quantitative adolescent food frequency questionnaire applied at a public school in São Paulo, Brazil.** *Eur J Clin Nutr* 2003, **57**:629-635.
- USDA: *National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25.* 2012.
- Howe PR, Meyer BJ, Record S, Baghurst K: **Contribution of red meat to very long chain omega-3 fatty acid (VLComega3) intake.** *Asia Pac J Clin Nutr* 2003, **12**:527.
- IBGE: *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, Análise de Consumo Alimentar no Brasil.* 2011: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); 2011.
- Karege F, Schwald M, Clise M: **Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets.** *Neurosci Lett* 2002, **328**:261-264.
- Schmidt HD, Duman RS: **Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models.** *Neuropsychopharmacology* 2010, **35**:2378-2391.
- Lang UE, Hellweg R, Seifert F, Schubert F, Gallinat J: **Correlation between serum brain-derived neurotrophic factor level and an in vivo marker of cortical integrity.** *Biol Psychiatry* 2007, **62**:530-535.

39. Frey BN, Andrezza AC, Houenou J, Jaimin S, Goldstein BI, Frye MA, Leboyer M, Berk M, Malhi GS, Lopez-Jaramillo C, Taylor VH, Dodd S, Frangou S, Hall GB, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Yatham LN, Kapczinski F, Young LT: **Biomarkers in bipolar disorder: a positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force.** *Aust N Z J Psychiatry* 2013, **47**(4):321–332.
40. Grande I, Kapczinski F, Sertiz L, Colpo GD, Kunz M, Cereser KM, Kauer-Sant'Anna M, Frey B, Vieta E, Magalhaes PV: **Peripheral brain-derived neurotrophic factor changes along treatment with extended release quetiapine during acute mood episodes: an open-label trial in drug-free patients with bipolar disorder.** *J Psychiatr Res* 2012, **46**:1511–1514.
41. Fernandes BS, Gama CS, Cereser KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, de Lucena D, Kunz M, Gomes FA, Kapczinski F: **Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis.** *J Psychiatr Res* 2011, **45**:995–1004.
42. Ruiz de Azua S, Matute C, Sertiz L, Mosquera F, Palomino A, de la Rosa I, Barbeito S, Vega P, Kapczinski F, González-Pinto A: **Plasma brain-derived neurotrophic factor levels, learning capacity and cognition in patients with first episode psychosis.** *BMC Psychiatry* 2013, **13**:27.

doi:10.1186/1476-511X-13-44

Cite this article as: Ferreira et al.: Correlation between n-3 polyunsaturated fatty acids consumption and BDNF peripheral levels in adolescents. *Lipids in Health and Disease* 2014 **13**:44.

PARTE III

1. DISCUSSÃO

Esta tese apresenta resultados de como procedimentos experimentais aparentemente inócuos no início da vida (manipulação neonatal e separação materna), bem como a diminuição de consumo de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega 3 (n-3 PUFA), em um modelo experimental de roedores (ratos *Wistar* machos) e do estudo com uma população de adolescentes em idade escolar, podem afetar padrões comportamentais e bioquímicos, central e sistemicamente.

Mais especificamente, esta tese demonstrou no capítulo 1 como a manipulação neonatal (MN) e a separação materna (SM) apresentam efeitos sobre o ganho de peso corporal e consumo de ração em ratos, sendo estes mais evidenciados quando consideramos o grupo submetido a SM em relação ao grupo controle. Considerando os dados comportamentais deste capítulo, nenhuma alteração de sintomas depressivos – mensurado pelo teste de nado forçado – foi encontrada entre os grupos estudados. Já o comportamento de busca de recompensa – medido pelo teste de preferência de solução doce – apresentou uma discreta alteração durante a realização do experimento, sendo apresentado um maior consumo de substância doce pelos animais submetidos a SM durante a segunda hora de exposição a esta substância. Entretanto, este efeito não foi de permanência consistente, conforme evidenciado pela reversão desta diferença ao final do teste. Por outro lado, a atividade locomotora em resposta a um psicoestimulante indicou um aumento na resposta de exploração por animais submetidos a MN em relação aos outros grupos experimentais. Analisando os parâmetros bioquímicos estudados por este capítulo, nenhuma das intervenções neonatais ou dietéticas apresentaram efeitos sobre as concentrações proteicas séricas de neurotrofina derivada do encéfalo (BDNF) ou sobre a expressão gênica de RNA mensageiro de BDNF no hipocampo. Contudo, reportamos a diminuição dos níveis proteicos hipocampais de BDNF induzida pela depleção dietética em n-3 PUFA.

Neste estudo tanto a exposição a um ambiente adverso durante o início da vida, quanto a uma dieta deficiente em n-3 PUFA foi capaz de influenciar desfechos comportamentais e bioquímicos durante a idade adulta. A abordagem metodológica adotada (*e.g.* deficiência dietética em n-3 PUFA) resultou na diminuição dos níveis proteicos de BDNF hipocampais. Adicionalmente, a exposição a diferentes tipos de intervenções durante o período neonatal (MN e SM) apresentou efeitos distintos sobre o consumo de alimento e o ganho de peso corporal. Animais submetidos a SM apresentaram peso corporal, consumo de ração e de solução doce aumentados, enquanto animais submetidos a MN apresentaram uma menor variação de ganho de peso em relação aos outros grupos, além de atividade locomotora aumentada em resposta a um psicoestimulante.

Para assegurar uma adequada função neuronal, o SNC requer elevados níveis de n-3 PUFA, particularmente do ácido docosaenoico (DHA), sendo que qualquer alteração em sua disponibilidade ou em sua quantidade nas membranas fosfolípídicas pode comprometer funções cognitivas e comportamentais [322]. Através do protocolo metodológico induzido neste estudo, podemos inferir que o padrão deficiente em n-3 PUFA afetou a capacidade de síntese de DHA encefálico. A deficiência de DHA durante a maturação encefálica reduz a plasticidade, alterando funções encefálicas na idade adulta [388]. Portanto, níveis dietéticos adequados de DHA são necessários para a resiliência neuronal e para a otimização da atividade cerebral, fornecendo mecanismos protetores contra transtornos neurológicos [388], podendo também reduzir a vulnerabilidade para transtornos mentais ou déficits cognitivos durante a idade adulta [388].

Nas últimas cinco décadas, a dieta de países ocidentais apresentou uma acentuada queda na composição de n-3 PUFA ingerido, com reportado aumento no

consumo de alimentos ricos em n-6 PUFA [389]. Estas alterações nos hábitos alimentares foram sugeridas como potenciais fatores para alterações de humor ou incidência de transtornos psiquiátricos [390]. Neste contexto, alguns estudos apontaram que a deficiência em n-3 PUFA possa ser um importante fator para a prevalência e gravidade de quadros de depressão [331, 391-393], embora alguns autores enfatizem que uma relação causal entre estes fatores não possa ser estabelecido [394]. Existem também evidências de que a exposição crônica ao estresse durante o início da vida possa aumentar o desenvolvimento de transtornos afetivos [167, 232, 395]. Desta maneira, propomos que a deficiência em n-3 PUFA poderia comprometer a resistência ao estresse, sendo investigados os efeitos relacionados desta deficiência e combinados ao estresse neonatal (MN e SM) sobre parâmetros comportamentais e níveis de BDNF de ratos adultos. Conforme mencionado previamente, fomos capazes de demonstrar que os níveis séricos de BDNF não se alteraram por esta depleção em n-3 PUFA, mesmo em associação ao estresse neonatal, embora seus níveis proteicos estejam diminuídos no hipocampo.

Pesquisas demonstraram que os níveis plasmáticos de BDNF são alterados nos diferentes estados de humor [213, 220, 228]. Por outro lado, discrepâncias foram encontradas entre estes achados. Fernandes *et al.* [214] reportaram que os níveis de BDNF diminuíram significativamente durante os episódios de mania e depressão, sugerindo ação desta molécula como potencial marcador periférico da progressão do Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) [213, 214, 219, 220, 222, 232, 233]. Considerando que a abordagem de depleção crônica em n-3 PUFA foi capaz de diminuir os níveis de BDNF hipocampal em ratos, hipotetizamos que um declínio nos níveis centrais desta neurotrofina poderia ser uma das primeiras alterações no SNC a ocorrer em transtornos psiquiátricos, precedendo qualquer modificação dos seus níveis periféricos.

De modo interessante, a expressão dos níveis de RNA mensageiro hipocampal de BDNF permaneceu inalterada. Desta maneira, a redução dos níveis proteicos de BDNF hipocampal em animais submetidos a deficiência crônica de n-3 PUFA poderia ser explicada por distintos mecanismos pós-traducionais, incluindo processamentos alternativos para a maturação da proteína ou possível degradação da molécula proteica de BDNF. Os mecanismos que compreendem estas modificações pós-traducionais, neste caso específico, ainda não foram completamente elucidados.

A relação dietética entre as razões de n-3 e n-6 PUFA também é considerada um importante elemento para a compreensão dos efeitos nutricionais sobre os diversos componentes biológicos. Conforme relatado por Clarke *et al.* [317] animais submetidos a SM apresentam um aumento da relação n-6:n-3 PUFA, primariamente resultante da redução de n-3 PUFA plasmático. Sendo assim, uma mediana deficiência dietética em n-3 PUFA, como aplicada em nosso estudo (razões n-6:n-3 PUFA: dieta adequada 2:1, dieta deficiente 6:1), pode ter efeitos amplificadores em indivíduos já deficientes. Bhatia *et al.* [388] demonstraram que reduções nos níveis de DHA cerebral e o aumento da relação n-6:n-3 PUFA, bem como o decréscimo dos níveis de BDNF e de suas sinalizações por intermédio do receptor tirosina cinase B (TrkB), em proporção aos níveis de DHA, reduzem as ativações de moléculas sinalizadoras relacionadas ao BDNF em determinadas áreas (*e.g.* proteína de ligação ao elemento responsivo à adenosina monofosfato cíclico, CREB). De acordo com esses autores, ratos alimentados com uma dieta deficiente em n-3 PUFA apresentaram diminuições nos níveis de BDNF e fosfo-CREB no hipotálamo e no hipocampo, sem alterações destes parâmetros no córtex frontal, comparados aos ratos alimentados com uma dieta adequada em n-3 PUFA. Também neste estudo todas as áreas apresentaram diminuições nos níveis de TrkB fosforilado. Nossos achados corroboram com esses dados, sendo encontrada em nossa

publicação que uma tênue diminuição nas razões n-6:n-3 PUFA foi suficiente para reduzir os níveis proteicos de BDNF hipocampal.

Considerando as relações entre intervenções neonatais e os níveis hipocampais de BDNF, Garoflos *et al.* [396] relataram que o procedimento de MN é capaz de ativar receptores de neurotransmissores, ocasionando o aumento da concentração de cálcio intracelular, da fosforilação do fator de transcrição de CREB e da expressão de BDNF no hipocampo de ratos. Já Lippmann *et al.* [397] evidenciaram a diminuição dos níveis hipocampais de BDNF maduro em animais submetidos a SM, embora os níveis de pró-BDNF permanecessem inalterados. Em nosso estudo, não encontramos diferenças nos níveis de BDNF entre os grupos estudados. Esta discrepância entre os resultados pode ser explicada pelas diferenças nos protocolos de manipulações aplicados, visto que outros autores utilizaram períodos mais longos ou mais curtos de execução de separação (*e.g.* 2, 4 e 8 horas somente no dia pós-natal [DPN] 1 [396] ou 180 minutos entre os DPN 2 a 14 [397]). Outra possível explicação se justifica no fato de que a idade de quantificação dos níveis de BDNF influenciaria os resultados desses estudos: Garoflos *et al.* [396] mensuraram os níveis de BDNF 2, 4 e 8 horas após o final do procedimento de manipulação, enquanto Lippmann *et al.* [397] o mediram apenas no DPN 95. Em nossa abordagem metodológica, analisamos as medidas hipocampais e séricas de BDNF no DPN 150. Embora o BDNF seja apontado como um dos principais fatores neurotróficos para a função do SNC, diferenciados cursos temporais de exposições aos padrões nutricionais avaliados ainda necessitam estimar seus reais efeitos sobre os níveis desta neurotrofina. Investigamos no presente estudo se diferentes razões dietéticas em n-6:n-3 PUFA, associadas ao estresse neonatal, modificariam os níveis de BDNF. Talvez as modificações dos níveis hipocampais de BDNF após intervenções neonatais possam ser mais pronunciadas durante os estágios iniciais da vida. Outros

estudos são necessários para verificar se os mecanismos relacionados ao processamento de BDNF diferem dos padrões fisiológicos após exposição ao estresse neonatal. Também se torna indispensável identificar as regiões do SNC e as circuitarias neurais associadas às modificações persistentes induzidas por estressores durante o início da vida.

Em relação ao consumo de ração e variação de peso corporal, nossos achados demonstram que animais alimentados com uma dieta n-3 PUFA deficiente exibiram menor peso corporal, sendo o procedimento de SM capaz de aumentar *per se*, sem interações com a deficiência em n-3 PUFA, o consumo de ração quando comparado aos outros procedimentos neonatais. Estes achados suportam a hipótese de que intervenções durante períodos críticos do desenvolvimento poderiam afetar o comportamento, a emoção e o metabolismo de maneira persistente [398], e que o procedimento de separação materna ocasiona alterações plásticas no SNC, aumentando o consumo de alimento e induzindo alterações metabólicas nestes animais [157]. A atual epidemia de obesidade e a alta prevalência de estresse perinatal (*e.g.* exposição crônica a doenças maternas, tais como diabetes *mellitus* ou hipertensão arterial sistêmica, tabagismo ou outras substâncias de abuso) [399, 400], em associação ao sedentarismo dos dias atuais e dietas ricas em gorduras e carboidratos, atentam para a importância na investigação de como o estresse neonatal atua para induzir o aumento do consumo de alimentos bem como do peso corporal.

O estado hedônico dos animais foi analisado com o uso de sacarose a 1% como um agente de recompensa. O valor de recompensa da sacarose é associado com a sua capacidade de liberação de dopamina no núcleo *accumbens* [401]. Achados com animais submetidos a diferentes estressores neonatais demonstraram aumentos ou, alternativamente, nenhuma alteração no consumo de sacarose ou de alimentos

palatáveis nessas condições experimentais [36, 159, 162, 402-404]. Nossos resultados demonstraram que animais submetidos a SM ingeriram uma maior quantidade de solução de sacarose a 1% na segunda hora após o início da exposição a esta substância, indicando que tais animais talvez necessitem de um maior espaço temporal para alcançar a saciedade. Sendo assim, o procedimento de SM pode ocasionar alterações nas respostas de reforço positivo após um determinado intervalo de tempo, sendo expresso peculiarmente pelo aumento no consumo de sacarose. Este efeito aparentemente não pode ser relacionado ao aspecto hedônico do animal, sendo os mecanismos centrais e/ou periféricos relacionados à saciedade os principais possíveis agentes envolvidos nesses achados comportamentais.

Mathieu *et al.* [315, 316] também investigaram os possíveis sinergismos entre os efeitos da exposição a SM e da deficiência dietética em n-3 PUFA sobre parâmetros comportamentais de ratos. Esses estudos demonstraram que o grupo submetido a SM e alimentado com uma dieta deficiente em n-3 PUFA apresentou maiores taxas de medo e de ansiedade, enquanto suas habilidades de enfrentamento de tarefas aversivas permaneceram inalteradas. Além disso, tanto a deficiência em n-3 PUFA quanto a SM aumentaram as respostas de recompensa e de impulsividade, sugerindo que o déficit de n-3 PUFA poderia ser um risco ambiental para maior vulnerabilidade de respostas depressivas induzidas pelo estresse crônico. Em nosso estudo, a deficiência de n-3 PUFA foi aplicada após o período de desmame (DPN 35), enquanto Mathieu *et al.* iniciaram a deficiência nutricional durante a gestação, permanecendo tal condição até a idade adulta das ninhadas. Além disso, as razões n-6:n-3 PUFA eram mais intensas nos estudos de Mathieu *et al.* Estas discrepâncias devem ser consideradas quando comparados os resultados obtidos em ambas as pesquisas.

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória destes animais, incluindo a avaliação de comportamento ansioso. Embora alterações motoras associadas com a deficiência em n-3 PUFA já tenham sido descritas em ratos [315, 405-407] e em camundongos [408], nossos resultados não demonstraram diferenças na atividade locomotora basal (após infusão de salina na forma intraperitoneal, *i.p.*) entre os grupos experimentais analisados. Alguns estudos reportaram que animais submetidos a MN apresentaram aumento nos cruzamentos de quadrantes [165, 409], enquanto animais submetidos a SM exibiam respostas exploratórias diminuídas [410], quando comparados aos animais controle neste mesmo teste comportamental. Contudo, autores também reportaram não haver diferença na atividade exploratória de animais submetidos a MN [411] ou a SM [412] comparados aos animais intactos. Brake *et al.* [411] publicaram que animais submetidos a MN eram menos responsivos a um desafio após infusão de um psicoestimulante (0,5 mg/Kg *i.p.*). Esta diferença com os nossos achados poderia ser explicada pelo tratamento farmacológico utilizado na análise locomotora: Brake *et al.* [411] utilizaram cocaína para este desafio, enquanto em nosso estudo utilizamos o cloridrato de anfepramona (dietilpropiona). Embora a anfepramona tenha aumentado a atividade exploratória em todos os grupos, seu efeito foi sinérgico com o estresse neonatal apenas em animais submetidos a MN. O fenótipo do espectro hiperativo tem sido associado com a diminuição na atividade dopaminérgica cortical, com concomitante aumento em sua atividade no núcleo *accumbens* [413, 414]. Desta maneira, nossos achados concordam com os dados demonstrados por Silveira *et al.*, na qual a atividade dopaminérgica está diminuída no núcleo *accumbens* de animais submetidos a MN [403].

Apresentamos no capítulo 2 as análises de estresse oxidativo e de funções mitocondriais hipocâmpais. Nesta estrutura encefálica de relevância, a atividade da

enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) não apresentou diferença estatística significativa, embora tenha sido observada tendência a uma diminuição de sua atividade nos grupos alimentados com dieta deficiente em n-3 PUFA. Também observamos um aumento da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) no hipocampo de animais submetidos a dieta deficiente em n-3 PUFA, quando comparados aos animais alimentados com ração adequada em n-3 PUFA. Adicionalmente a este achado, nenhum efeito individual da exposição a MN ou a SM foi encontrada na atividade da enzima GPx hipocampal. Entretanto, revelamos que o estresse neonatal (MN e SM) e a deficiência de n-3 PUFA interagem sobre a atividade da enzima GPx hipocampal, pelo fato de animais alimentados com dieta deficiente em n-3 PUFA apresentaram um maior aumento da atividade de GPx quando submetidos a algum dos protocolos de estresse neonatal estudados. Em relação à enzima catalase (CAT) hipocampal, animais alimentados com uma dieta deficiente em n-3 PUFA apresentaram maiores níveis de sua atividade em relação a animais alimentados com uma dieta n-3 adequada. As razões enzimáticas hipocampais SOD/GPx, bem como de SOD/CAT também foram estimadas, demonstrando não haver desequilíbrios em suas atividades entre os grupos analisados. A avaliação da produção de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (EROs) no hipocampo foi inferida pela oxidação de diclorofluoresceína (DCFH). Os níveis de DCFH foram maiores em hipocampus de animais alimentados com uma dieta deficiente em n-3 PUFA, em relação aos alimentados com dieta adequada em n-3 PUFA. Embora não encontrado nenhum efeito individual da MN ou da SM sobre a produção de radicais livres, nossos resultados apontam uma interação entre o estresse neonatal e a deficiência em n-3 PUFA, onde ambos contribuiriam amplificando mais a produção de radicais livres no hipocampo. O conteúdo de tiol total, um componente do sistema antioxidante não enzimático, foi medido no hipocampo dos grupos experimentais. Individualmente, o

estresse neonatal foi capaz de diminuir os níveis de tióis totais em relação aos animais controle, enquanto a deficiência de n-3 PUFA aumentou este parâmetro em comparação aos animais alimentados com dieta adequada em n-3 PUFA. De forma interessante, uma interação estresse neonatal e depleção de n-3 PUFA foi observada neste parâmetro, onde o aumento da quantidade de tióis totais induzido pela diminuição dietética de n-3 PUFA foi maior em animais submetidos a MN e a MS alimentados com esta dieta em relação aos animais submetidos a dieta adequada em n-3 PUFA. Considerando os aspectos mitocondriais avaliados no hipocampo, tanto a massa mitocondrial quanto a atividade dos complexos da cadeia respiratória (*e.g.* I-III, II, IV) permaneceram inalteradas pelos protocolos experimentais aplicados. Todavia, as abordagens metodológicas neonatais aplicadas em nosso estudo (MN e SM) apresentaram efeito sobre o potencial mitocondrial, reduzindo o valor deste parâmetro, especialmente em animais submetidos a MN.

Hipotetizamos para este estudo que o estresse neonatal e a exposição a uma deficiência em n-3 PUFA poderiam interagir para produzir alterações sobre a função mitocondrial e parâmetros de estresse oxidativo hipocampal. Algumas interações foram possíveis de detecção, tais como o aumento de atividades enzimáticas antioxidantes (*e.g.* GPx, CAT), da produção de radicais livres e do conteúdo total de tióis induzidos pela dieta deficiente em n-3 PUFA, sendo estes aumentos principalmente nos animais submetidos aos estressores neonatais. Adicionalmente, a redução do potencial mitocondrial foi encontrada apenas em animais submetidos a MN durante o período neonatal.

Ao se analisarem estes resultados, torna-se importante considerarmos as diferentes razões de n-6:n-3 PUFA em nossos tratamentos dietéticos (2:1 na dieta adequada em n-3 PUFA e 6:1 na dieta deficiente em n-3 PUFA). Conforme já

mencionado, as vias de sinalização relacionadas aos n-3 PUFA são antiinflamatórias, enquanto as que envolvem os n-6 PUFA são pró-inflamatórias [415], sendo ambas as séries de PUFA competidoras entre si pelas mesmas enzimas [287, 416]. Neste sentido, uma dieta equilibrada com razões n-6:n-3 PUFA se torna indispensável para a homeostase metabólica. Embora nossa dieta deficiente em n-3 PUFA induza apenas uma moderada deficiência, esta intervenção foi capaz de aumentar os níveis de atividades de GPx e CAT no hipocampo de ratos. Os níveis de SOD permaneceram inalterados entre todos os grupos experimentais, juntamente com as razões entre SOC/GPx e SOD/CAT. Outro dado importante observado em nosso estudo foi o maior nível de tióis totais no hipocampo, induzido pela deficiência em n-3 PUFA. Estes níveis de tióis se correlacionam inversamente aos danos oxidativos às proteínas locais. Ao considerarmos em conjunto com os dados de redução da atividade da GPx, tais parâmetros nos permitem sugerir que as células estejam aumentando a produção de tióis e de glutathiona na tentativa de ajustar os níveis da atividade da GPx, visto esta ser um importante doador de hidrogênio. Talvez este aumento observado nas enzimas antioxidantes seja uma tentativa de compensar os níveis de produção de radicais livres no hipocampo, também aumentado pela deficiência em n-3 PUFA, prevenindo assim os possíveis danos às proteínas, DNA e lipídeos celulares.

Interações entre intervenções perinatais e os tratamentos dietéticos foram observados em parâmetros bioquímicos relacionados ao desequilíbrio oxidativo. É interessante observar os perfis similares de produção de EROs, atividade de GPx e conteúdo total de tióis entre os grupos estressados neonatalmente, alimentados com dietas adequada ou deficiente em n-3 PUFA. É possível especular que estes parâmetros estejam relacionados em suas respostas, sendo a quantidade aumentada da produção de EROs refletida pela atividade da GPx e pelo conteúdo de tióis (particularmente de

glutathiona, visto esta ser necessária para a ação da GPx). Animais submetidos a SM apresentaram menor produção de EROs e menor conteúdo de tióis, sendo difícil determinar se este menor padrão de produção seria favorável ou não, visto que a produção de EROs é um componente importante para diferentes funções, incluindo reações metabólicas e sinalizações celulares [417].

Um estudo demonstrou que a deficiência transgeracional em n-3 PUFA foi capaz de aumentar a peroxidação lipídica, influenciando a atividade da SOD e da CAT no núcleo estriado e na substância *nigra* de diversas formas, mesmo em diferentes estágios do desenvolvimento [418]. Desta forma, os nossos resultados de deficiência em n-3 PUFA demonstram a importância deste fator dietético para a manutenção de um equilíbrio redox efetivo no hipocampo. Estes resultados reforçam a hipótese de que a deficiência em n-3 PUFA poderia aumentar o risco para certos transtornos de humor ou de memória, sendo o hipocampo uma das principais estruturas envolvidas nestas funções, onde desequilíbrios oxidativos foram reportados concomitantemente a essas alterações [419].

Os grupos que sofreram intervenções neonatais diminuíram o potencial de membrana mitocondrial em relação aos animais controle, sendo este efeito particularmente proeminente em animais submetidos a MN. Este resultado pode ser relacionado com características apoptóticas precoces, possivelmente induzidas pelo dano oxidativo. Noschang *et al.* [160] reportaram que ratos *Wistar* machos submetidos a MN, quando adultos, apresentam elevados níveis de quebra de DNA no hipocampo, o que poderia ser ocasionado pelo desequilíbrio oxidativo. Outro enfoque a ser considerado são as possíveis modificações epigenéticas e pós-traducionais envolvidas nestes processos, sendo os achados do presente estudo capaz de identificar que a deficiência em n-3 PUFA alterou a funcionalidade das enzimas antioxidantes. Nosso

grupo de pesquisa e outros já demonstraram que a MN é capaz de ocasionar diferenças em parâmetros comportamentais e neuroquímicos destes animais durante a adolescência e idade adulta [158, 160, 420]. Também demonstramos que animais submetidos a MN e a SM, expostos cronicamente a uma deficiência em n-3 PUFA, apresentaram menores níveis da neurotrofina BDNF no hipocampo [421]. Considerados em conjunto, esta diminuição de BDNF, associada ao desequilíbrio oxidativo e a diminuição do potencial mitocondrial, torna sugestivo o envolvimento da mitocôndria na modulação hipocampal de parâmetros de neuroproteção e/ou dano em animais estressados durante o período neonatal. Estudos são necessários para elucidar os possíveis envolvimento de funcionalidades bioquímicas mitocondriais e possíveis modificações epigenéticas como fatores de vulnerabilidade para animais estressados neonatalmente.

Adicionalmente, nenhum efeito de intervenções neonatais ou dietéticas foram observados nas atividades dos complexos proteicos da cadeia respiratória. Desta forma, a diminuição do potencial mitocondrial encontrado em animais submetidos a MN poderia ser relacionada a outros mecanismos, tais como proteínas desacopladoras (UCPs) [422, 423]. Considerados em conjunto, estes resultados sugerem que animais submetidos a intervenções neonatais, tais como as aplicadas neste estudo, exibiram uma maior susceptibilidade de demanda energética hipocampal, sendo mais afetados pela dieta n-3 deficiente em PUFA, o que poderia ocasionar um estado de desequilíbrio oxidativo no hipocampo. Maiores estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos nestes processos. Outro ponto a ser considerado seria se estas modificações são ou não permanentes, bem como verificar a possibilidade de reversão destes parâmetros de desequilíbrio oxidativo pela aplicação de uma dieta adequada em n-3 PUFA.

Conforme apresentado no capítulo 3, fomos capazes de demonstrar, em um estudo com uma população de adolescentes, que os níveis consumidos de n-3 PUFA se relacionam com os níveis séricos de BDNF, corroborando com a proposta de possíveis influências de nutrientes, tais como os n-3 PUFA, sobre a incidência de transtornos psiquiátricos, bem como uma possível mediação por alterações dos níveis de neurotrofinas, tal como o BDNF. O BDNF pode influenciar processos fisiológicos envolvidos em transtornos psiquiátricos (*e.g.* transtornos de humor), assim como alterar a composição de n-3 PUFA em membranas celulares, modular os sistemas neurobiológicos envolvidos em respostas comportamentais, o neurodesenvolvimento e padrões de estresse oxidativo em áreas encefálicas específicas [260, 301, 394, 424]. Nosso estudo envolveu 137 adolescentes recrutados de uma amostra que incluía indivíduos com elevados índices de ansiedade, mensurados por testes psicométricos específicos (*SCARED*) do Programa de Transtornos de Ansiedade para Crianças e Adolescentes (PROTAIA) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – podendo a descrição completa desta população ser detalhadamente encontrada em outras publicações deste grupo de pesquisa [425-427]. Em resumo, todos os quartis de distribuição da escala psicométrica em questão estão equivalentemente representados na população estudada (*e.g.* “não muito ansioso”, “medianamente ansioso”, “moderadamente ansioso”, “gravemente ansioso”), embora apresentasse uma população maior de participantes do quartil superior (“gravemente ansioso”). A escala psicométrica *SCARED* é composta por 38 itens que podem ser agrupados em subescalas de acordo com os diferentes sintomas de ansiedade investigados, sendo uma abordagem consistente para o diagnóstico de transtorno de ansiedade durante a infância, conforme o Manual de Diagnóstico Médico IV (DSM-IV). Já os níveis de n-3 PUFA consumidos foram estimados pela aplicação do

questionário de frequência alimentar (QFA) [428, 429], um questionário contendo uma lista de 94 alimentos e bebidas. Após a realização quantitativa do consumo de micronutrientes e macronutrientes, correlações estatísticas foram aplicadas para analisar o consumo de n-3 PUFA e os níveis séricos de BDNF, sendo concomitantemente avaliados os efeitos de potenciais variáveis confundidoras (*e.g.* consumo de ácido graxo total, idade, gênero, sintomas de ansiedade).

Estudos com a depleção de n-3 PUFA, em roedores, reportam sua ação sobre o aumento dos níveis de agressão, de depressão e de ansiedade [315, 316, 322, 324-326]. Adicionalmente, a privação de n-3 PUFA altera a expressão de BDNF no córtex frontal, além de diminuir a atividade da proteína cinase ativada por mitógenos p38 (MAPK) [327]. As fontes correspondentes de consumo de n-3 PUFA para o nosso estudo foram mensuradas pelo QFA, incluindo diversos óleos vegetais e produtos baseados em óleos (*e.g.* biscoitos, maionese, alimentos fritos), sendo os cálculos realizados de acordo com os valores dispostos na “Tabela Americana de Alimentos” [429]. Para esses cálculos, além do consumo de peixe e de óleos, a carne vermelha também é considerada uma fonte de n-3 PUFA [430], sendo a nossa região especialmente conhecida por apresentar um elevado consumo de carne. Uma pesquisa nacional sobre o consumo individual de alimentos, conduzida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em áreas rurais e urbanas entre os anos 2008 e 2009 [431], identificou a região Sul do Brasil e o estado do Rio Grande do Sul, como uma das regiões com maior consumo de carne de gado e de porco. Adicionalmente, também foi demonstrado por esta pesquisa que, para a população na faixa etária de 10 a 13 anos, o consumo diário de n-3 PUFA foi relativamente alto nesta região (média de 1,5g/dia), em comparação com outras regiões brasileiras. O consumo de carne é culturalmente alto e típico em nossa região, fato que possivelmente corrobora com os altos níveis de consumo de n-3 PUFA por este

estudo. Apesar de nosso estudo apresentar limitações (*e.g.* pequeno tamanho amostral e com elevada incidência de adolescentes ansiosos) que poderiam limitar nossa validade externa, fomos capazes de detectar uma correlação entre o consumo de n-3 PUFA e os níveis séricos de BDNF. A real relação entre os níveis periféricos de BDNF e os níveis centrais desta neurotrofina ainda carecem de investigações, embora relações positivas entre os níveis séricos e corticais de BDNF tenham sido publicados por estudos pré-clínicos [432, 433], além de funções celulares e comportamentais serem passíveis de modificações por influência de BDNF periférico [434]. Além disso, um estudo associou os níveis séricos de BDNF com a integridade neuronal de sujeitos saudáveis [435], sendo o achado de sua diminuição periféricamente (*e.g.* BDNF sérico ou plasmático) consistentemente encontrado em pacientes com transtornos de humor [213, 216-218]. Estudos recentes demonstraram que os níveis periféricos de BDNF são consistentemente relacionados com a atividade e a progressão do Transtorno Afetivo Bipolar [214, 216], bem como com a alteração cognitiva em pacientes após o primeiro episódio psicótico [221]. Pela participação do BDNF em uma variedade de processos neurais, esta neurotrofina está intimamente relacionada aos estágios de desenvolvimento neuronal tanto em humanos quanto em outras espécies animais [436]. Os níveis da proteína sérica BDNF poderiam se refletir em alguns aspectos da plasticidade neuronal de humanos, atuando tal proteína como reguladora dos processos de sobrevivência e diferenciação neuronal [224, 225, 435]. Mais estudos são necessários para a compreensão de como o consumo de n-3 PUFA afeta de fato os níveis séricos e centrais de BDNF, bem como da forma como esta situação poderia influenciar a vulnerabilidade para transtornos psiquiátricos, especialmente durante certos estágios da vida, tal como a adolescência.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta deficiente em n-3 ácidos graxos poliinsaturados (n-3 PUFA), em associação aos estressores neonatais aplicados neste estudo (manipulação neonatal e separação materna), foram capazes de alterar o peso corporal e o consumo de ração de maneira específica, sendo evidenciados maiores índices destes parâmetros nos animais separados matematicamente. Já o grupo manipulado alimentado com dieta deficiente em n-3 PUFA apresentou maior atividade exploratória em resposta a um psicoestimulante.

Apesar dos níveis séricos e da expressão gênica hipocampal do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) permanecerem inalterados pelos tratamentos aplicados, fomos capazes de evidenciar a diminuição proteica de BDNF no hipocampo de animais submetidos a uma dieta deficiente em n-3 PUFA.

Considerando os parâmetros mitocondriais e de estresse oxidativo, as atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram aumentadas em hipocampus de ratos submetidos a uma deficiência crônica em n-3 PUFA. Esta deficiência apresentou interações com o fator de estresse neonatal em alguns destes parâmetros (*e.g.* atividade da GPx, produção de EROs), indicando um possível sinergismo entre os fatores estresse neonatal e deficiência em n-3 PUFA. Os níveis de tióis foram significativamente diminuídos pelos estressores neonatais, sendo a dieta deficiente em n-3 PUFA capaz de aumentar a quantidade de tiol total no hipocampo. Por outro lado, animais estressados tratados cronicamente com uma dieta deficiente em n-3 PUFA apresentaram maiores níveis de tióis no hipocampo. Além disso, a manipulação neonatal *per se* foi capaz de diminuir o potencial hipocampal mitocondrial.

Em nosso estudo com adolescentes em idades escolares, apesar de apresentarmos algumas limitações (*e.g.* pequeno tamanho amostral com elevada

incidência de adolescentes ansiosos), o que poderiam limitar a validade externa deste resultado, fomos capazes de detectar uma correlação entre o consumo de n-3 PUFA e os níveis séricos de BDNF em adolescentes.

3. CONCLUSÕES

Como conclusões gerais, esta tese apresentou que a manipulação neonatal e a separação materna, associados a uma mediana deficiência crônica em n-3 PUFA, foram capazes de alterar parâmetros comportamentais e neuroquímicos na idade adulta. Evidenciamos que este sinergismo foi capaz de diminuir a proteína de BDNF no hipocampo destes animais, mesmo não apresentando qualquer alteração periférica de BDNF. Uma correlação entre os níveis consumidos de n-3 PUFA, em uma população de adolescentes em idade escolar, com os níveis séricos de BDNF também foi encontrada. Adicionalmente, as alterações nas atividades enzimáticas observadas no hipocampo de animais submetidos a nossa abordagem metodológica reforçam a importância da participação mitocondrial e a sua possível relação com o desenvolvimento e estabelecimento de transtornos psiquiátricos.

4. PERSPECTIVAS

Os comportamentos sociais são fundamentais para a sobrevivência de mamíferos que vivem em sociedade. Após o nascimento, os mamíferos dependem da mãe e de um ambiente propício para que haja um desenvolvimento adequado. O estresse sofrido na infância mostrou ser extremamente danoso para o SNC em humanos e em outras espécies de animais, afetando habilidades (*e.g.* memória e sociabilidade). Considerando que durante o desenvolvimento do animal os eventos que acontecem afetam sistemas neurais e comportamentos, justificamos a necessidade do estudo das variações no ambiente do recém-nascido e a sua relação com comportamentos sociais durante a infância e, futuramente, na vida adulta. Sendo assim, propomos a avaliação de nossa abordagem metodológica sobre as relações e interações sociais de ratos *Wistar* machos durante o período neonatal (*e.g.* teste de preferência olfatória) e período peripuberal/puberal (*e.g.* comportamento de brincadeira – *Play Behavior Test*).

Conforme sugerido pelos revisores da Revista *Neurochemical Research*, a quantificação de dano (*e.g.* grupo carbonil e nível de peroxidação) no hipocampo caracterizariam melhor o estresse oxidativo induzido pela combinação do estresse neonatal e da deficiência nutricional em n-3 PUFA.

A determinação dos níveis de Neuroprotectina D1 contribuiriam com os nossos achados de BDNF no hipocampo, sendo necessária a investigação minuciosa de componentes da via de sinalização de BDNF (*e.g.* expressão gênica de receptores membranares, translocação de GRs em resposta ao estresse) e possíveis modificações pós-traducionais induzidas pelo nosso protocolo em áreas encefálicas de interesse. Nesta perspectiva, possíveis inferências destes resultados poderiam ser transpostas em estudos translacionais de investigações clínicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Holbrook JD: **An epigenetic escape route.** *Trends Genet* 2015, **31**(1):2-4.
2. Portha B, Fournier A, Kioon MD, Mezger V, Movassat J: **Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility.** *Biochimie* 2014, **97**:1-15.
3. Ong ML, Lin X, Holbrook JD: **Measuring epigenetics as the mediator of gene/environment interactions in DOHaD.** *J Dev Orig Health Dis* 2014:1-7.
4. Wang XM: **Early life programming and metabolic syndrome.** *World J Pediatr* 2013, **9**(1):5-8.
5. Ruchat SM, Hivert MF, Boucharde L: **Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus.** *Nutr Rev* 2013, **71 Suppl 1**:S88-94.
6. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA: **Developmental origins of health and disease (DOHaD).** *J Pediatr (Rio J)* 2007, **83**(6):494-504.
7. Fox DA, Grandjean P, de Groot D, Paule MG: **Developmental origins of adult diseases and neurotoxicity: epidemiological and experimental studies.** *Neurotoxicology* 2012, **33**(4):810-816.
8. Sinclair KD, Singh R: **Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo.** *Theriogenology* 2007, **67**(1):43-53.
9. van Deutekom AW, Chinapaw MJ, Vrijkotte TG, Gemke RJ: **Study protocol: the relation of birth weight and infant growth trajectories with physical fitness, physical activity and sedentary behavior at 8-9 years of age - the ABCD study.** *BMC Pediatr* 2013, **13**:102.
10. Garner AS, Shonkoff JP, Health CoPAoCaF, Committee on Early Childhood Ao, and Dependent Care, Pediatrics SoDaB: **Early childhood adversity, toxic**

- stress, and the role of the pediatrician: translating developmental science into lifelong health.** *Pediatrics* 2012, **129**(1):e224-231.
11. Broekman BF: **Stress, vulnerability and resilience, a developmental approach.** *Eur J Psychotraumatol* 2011, **2**.
 12. Räikkönen K, Pesonen AK: **Early life origins of psychological development and mental health.** *Scand J Psychol* 2009, **50**(6):583-591.
 13. Bruce KD, Byrne CD: **The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder.** *Postgrad Med J* 2009, **85**(1009):614-621.
 14. Vignini A, Raffaelli F, Cester A, Iannilli A, Cherubini V, Mazzanti L, Nanetti L: **Environmental and genetical aspects of the link between pregnancy, birth size, and type 2 diabetes.** *Curr Diabetes Rev* 2012, **8**(3):155-161.
 15. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ: **Weight in infancy and death from ischaemic heart disease.** *Lancet* 1989, **2**(8663):577-580.
 16. Fall CH, Barker DJ, Osmond C, Winter PD, Clark PM, Hales CN: **Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischaemic heart disease.** *BMJ* 1992, **304**(6830):801-805.
 17. Fukushima N, Gundry SR, Razzouk AJ, Bailey LL: **Risk factors for graft failure associated with pulmonary hypertension after pediatric heart transplantation.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994, **107**(4):985-989.
 18. Martyn CN, Barker DJ: **Reduced fetal growth increases risk of cardiovascular disease.** *Health Rep* 1994, **6**(1):45-53.
 19. Forsén T, Osmond C, Eriksson JG, Barker DJ: **Growth of girls who later develop coronary heart disease.** *Heart* 2004, **90**(1):20-24.

20. Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C: **Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis.** *Int J Epidemiol* 2002, **31**(6):1235-1239.
21. Barker DJ, Forsén T, Uutela A, Osmond C, Eriksson JG: **Size at birth and resilience to effects of poor living conditions in adult life: longitudinal study.** *BMJ* 2001, **323**(7324):1273-1276.
22. Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ: **Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study.** *BMJ* 2001, **322**(7292):949-953.
23. Fisher D, Baird J, Payne L, Lucas P, Kleijnen J, Roberts H, Law C: **Are infant size and growth related to burden of disease in adulthood? A systematic review of literature.** *Int J Epidemiol* 2006, **35**(5):1196-1210.
24. Morley R, McCalman J, Carlin JB: **Birthweight and coronary heart disease in a cohort born 1857-1900 in Melbourne, Australia.** *Int J Epidemiol* 2006, **35**(4):880-885.
25. O'Dea K: **Overview of the thrifty genotype hypothesis.** *Asia Pac J Clin Nutr* 1995, **4**(4):339-340.
26. Hales CN, Barker DJ: **Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.** *Diabetologia* 1992, **35**(7):595-601.
27. Silveira PP, Manfro GG: **Retrospective studies.** *Adv Neurobiol* 2015, **10**:251-267.
28. Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA: **Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health.** *Neurosci Biobehav Rev* 2015, **48C**:70-91.

29. Lane RH: **Fetal Programming, Epigenetics, and Adult Onset Disease.** *Clin Perinatol* 2014, **41**(4):815-831.
30. Li CC, Maloney CA, Cropley JE, Suter CM: **Epigenetic programming by maternal nutrition: shaping future generations.** *Epigenomics* 2010, **2**(4):539-549.
31. Joss-Moore LA, Metcalfe DB, Albertine KH, McKnight RA, Lane RH: **Epigenetics and fetal adaptation to perinatal events: diversity through fidelity.** *J Anim Sci* 2010, **88**(13 Suppl):E216-222.
32. Gicquel C, El-Osta A, Le Bouc Y: **Epigenetic regulation and fetal programming.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008, **22**(1):1-16.
33. Rutter M, Sroufe LA: **Developmental psychopathology: concepts and challenges.** *Dev Psychopathol* 2000, **12**(3):265-296.
34. Haugen AC, Schug TT, Collman G, Heindel JJ: **Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences.** *J Dev Orig Health Dis* 2014:1-10.
35. Meredith RM, Dawitz J, Kramvis I: **Sensitive time-windows for susceptibility in neurodevelopmental disorders.** *Trends Neurosci* 2012, **35**(6):335-344.
36. Dalmaz C, Noschang C, Krolow R, Rainecki C, Lucion AB: **How postnatal insults may program development: studies in animal models.** *Adv Neurobiol* 2015, **10**:121-147.
37. Aldwin CM, Sutton KJ, Lachman M: **The development of coping resources in adulthood.** *J Pers* 1996, **64**(4):837-871.
38. Zanutto BS, Frías BC, Valentinuzzi ME: **Blood pressure long term regulation: a neural network model of the set point development.** *Biomed Eng Online* 2011, **10**:54.

39. Nederhof E, Schmidt MV: **Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects.** *Physiol Behav* 2012, **106**(5):691-700.
40. Nederhof E: **The mismatch hypothesis of psychiatric disease.** *Physiol Behav* 2012, **106**(5):689-690.
41. Kozlov AI, Kozlova MA: **[Cortisol as a marker of stress].** *Fiziol Cheloveka* 2014, **40**(2):123-136.
42. Oskis A, Clow A, Loveday C, Hucklebridge F, Sbarra DA: **Biological Stress Regulation in Female Adolescents: A Key Role for Confiding.** *J Youth Adolesc* 2014.
43. Klumbies E, Braeuer D, Hoyer J, Kirschbaum C: **The reaction to social stress in social phobia: discordance between physiological and subjective parameters.** *PLoS One* 2014, **9**(8):e105670.
44. Papadopoulos E, Muir C, Russell C, Timmons BW, Falk B, Klenrou P: **Markers of biological stress and mucosal immunity during a week leading to competition in adolescent swimmers.** *J Immunol Res* 2014, **2014**:234565.
45. Cooper SJ: **From Claude Bernard to Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis.** *Appetite* 2008, **51**(3):419-427.
46. Homberg JR: **The stress-coping (mis)match hypothesis for nature × nurture interactions.** *Brain Res* 2012, **1432**:114-121.
47. Claessens SE, Daskalakis NP, van der Veen R, Oitzl MS, de Kloet ER, Champagne DL: **Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences.** *Psychopharmacology (Berl)* 2011, **214**(1):141-154.

48. Veissier I, Boissy A: **Stress and welfare: two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view.** *Physiol Behav* 2007, **92**(3):429-433.
49. Selye H: **A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936.** *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998, **10**(2):230-231.
50. Goldstein DS, Frank SM: **The wisdom of the body revisited: the adrenomedullary response to mild core hypothermia in humans.** *Endocr Regul* 2001, **35**(1):3-7.
51. Sternberg EM: **Walter B. Cannon and " 'Voodoo' Death": a perspective from 60 years on.** *Am J Public Health* 2002, **92**(10):1564-1566.
52. Cannon WB: **Voodoo death.** *Psychosom Med* 1957, **19**(3):182-190.
53. Contoreggi C: **Corticotropin releasing hormone and imaging, rethinking the stress axis.** *Nucl Med Biol* 2014.
54. Kovács KJ: **CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress.** *J Chem Neuroanat* 2013, **54**:25-33.
55. Dhabhar FS: **Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful.** *Immunol Res* 2014, **58**(2-3):193-210.
56. Maniam J, Antoniadis C, Morris MJ: **Early-Life Stress, HPA Axis Adaptation, and Mechanisms Contributing to Later Health Outcomes.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014, **5**:73.
57. Dallman MF, Jones MT: **Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat.** *Endocrinology* 1973, **92**(5):1367-1375.

58. Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N: **Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B.** *Recent Prog Horm Res* 1987, **43**:113-173.
59. Hough D, Storbeck K, Cloete SW, Swart AC, Swart P: **Relative contribution of P450c17 towards the acute cortisol response: lessons from sheep and goats.** *Mol Cell Endocrinol* 2015.
60. Chistiakova NV, Savost'ianov KV: **[The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and genetic variants affecting its reactivity].** *Genetika* 2011, **47**(8):1013-1025.
61. Myers B, McKlveen JM, Herman JP: **Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback.** *Cell Mol Neurobiol* 2012.
62. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W: **Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents.** *Gen Comp Endocrinol* 2013, **181**:306-309.
63. Peeters B, Boonen E, Langouche L, Van den Berghe G: **The HPA axis response to critical illness: New study results with diagnostic and therapeutic implications.** *Mol Cell Endocrinol* 2014.
64. Bremner JD, Narayan M: **The effects of stress on memory and the hippocampus throughout the life cycle: implications for childhood development and aging.** *Dev Psychopathol* 1998, **10**(4):871-885.
65. Lee TK, Lee C, Bischof R, Lambert GW, Clarke IJ, Henry BA: **Stress-induced behavioral and metabolic adaptations lead to an obesity-prone phenotype in ewes with elevated cortisol responses.** *Psychoneuroendocrinology* 2014, **47**:166-177.
66. Mondelli V: **From stress to psychosis: whom, how, when and why?** *Epidemiol Psychiatr Sci* 2014, **23**(3):215-218.

67. Akirav I: **Cannabinoids and glucocorticoids modulate emotional memory after stress.** *Neurosci Biobehav Rev* 2013, **37**(10 Pt 2):2554-2563.
68. Berardelli R, Karamouzis I, D'Angelo V, Zichi C, Fussotto B, Giordano R, Ghigo E, Arvat E: **Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans.** *Endocrine* 2013, **43**(1):51-58.
69. Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B: **Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms.** *Braz J Med Biol Res* 2012, **45**(4):292-298.
70. Hill MN, Tasker JG: **Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.** *Neuroscience* 2012, **204**:5-16.
71. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J: **Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin.** *Science* 1981, **213**(4514):1394-1397.
72. Rivier C, Vale W: **Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo.** *Endocrinology* 1983, **113**(3):939-942.
73. Bale TL, Chen A: **Minireview: CRF and Wylie Vale: a story of 41 amino acids and a Texan with grit.** *Endocrinology* 2012, **153**(6):2556-2561.
74. Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalou P, Lelias JM, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P: **Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors.** *FEBS Lett* 1993, **335**(1):1-5.

75. Patthy M, Horvath J, Mason-Garcia M, Szoke B, Schlesinger DH, Schally AV: **Isolation and amino acid sequence of corticotropin-releasing factor from pig hypothalami.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(24):8762-8766.
76. Ling N, Esch F, Böhlen P, Baird A, Guillemin R: **Isolation and characterization of caprine corticotropin-releasing factor.** *Biochem Biophys Res Commun* 1984, **122**(3):1218-1224.
77. Rivier J, Spiess J, Vale W: **Characterization of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**(15):4851-4855.
78. Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W: **Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**(10):6517-6521.
79. Plotsky PM, Sawchenko PE: **Hypophysial-portal plasma levels, median eminence content, and immunohistochemical staining of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin after pharmacological adrenalectomy.** *Endocrinology* 1987, **120**(4):1361-1369.
80. Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW: **Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**(6):1883-1887.
81. Sawchenko PE, Swanson LW: **Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain.** *Fed Proc* 1985, **44**(1 Pt 2):221-227.

82. Sawchenko PE: **Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic, peptide, and steroid specificity.** *J Neurosci* 1987, **7**(4):1093-1106.
83. Sawchenko PE: **Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus.** *Brain Res* 1987, **403**(2):213-223.
84. Sawchenko PE: **Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus.** *Brain Res* 1987, **437**(2):253-263.
85. Sawchenko PE: **Effects of catecholamine-depleting medullary knife cuts on corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamus of normal and steroid-manipulated rats.** *Neuroendocrinology* 1988, **48**(5):459-470.
86. Bruhn TO, Plotsky PM, Vale WW: **Effect of paraventricular lesions on corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the stalk-median eminence: studies on the adrenocorticotropin response to ether stress and exogenous CRF.** *Endocrinology* 1984, **114**(1):57-62.
87. Mialhe C: **[The hypothalamic regulation of ACTH secretion].** *Probl Actuels Endocrinol Nutr* 1966, **10**:161-187.
88. Saffran M: **Hypothalamic regulation of ACTH secretion.** *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1966, **43**:36-46.
89. Haugen HN: **[Regulation of adrenal cortex function].** *Tidsskr Nor Laegeforen* 1970, **90**(21):1966-1969.

90. Birmingham MK, Kurlents E, Rochefort GJ, Saffran M, Schally AV: **ACTH content of rat pituitary glands.** *Endocrinology* 1956, **59**(6):677-680.
91. Saffran M, Schally AV: **Effect of histamine, hog vasopressin, and corticotropin-releasing factor (CRF) on ACTH release in vitro.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1956, **92**(3):636-637.
92. Ter Heegde F, De Rijk RH, Vinkers CH: **The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience.** *Psychoneuroendocrinology* 2015, **52C**:92-110.
93. Nicolaidis NC, Charmandari E, Chrousos GP, Kino T: **Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor.** *BMC Endocr Disord* 2014, **14**:71.
94. Oakley RH, Cidlowski JA: **The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2013, **132**(5):1033-1044.
95. Vardimon L, Ben-Dror I, Avisar N, Oren A, Shiftan L: **Glucocorticoid control of glial gene expression.** *J Neurobiol* 1999, **40**(4):513-527.
96. Reul JM, Sutanto W, van Eekelen JA, Rothuizen J, de Kloet ER: **Central action of adrenal steroids during stress and adaptation.** *Adv Exp Med Biol* 1990, **274**:243-256.
97. McEwen BS: **Influences of adrenocortical hormones on pituitary and brain function.** *Monogr Endocrinol* 1979, **12**:467-492.
98. Angelucci L: **The hypothalamus-pituitary--adrenocortical axis: epigenetic determinants changes with aging, involvement of NGF.** *Neurochem Int* 1994, **25**(1):53-59.

99. Solberg LC, Baum AE, Ahmadiyeh N, Shimomura K, Li R, Turek FW, Takahashi JS, Churchill GA, Redei EE: **Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis.** *Physiol Genomics* 2006, **27**(3):362-369.
100. Conway-Campbell BL, Sarabdjitsingh RA, McKenna MA, Pooley JR, Kershaw YM, Meijer OC, De Kloet ER, Lightman SL: **Glucocorticoid ultradian rhythmicity directs cyclical gene pulsing of the clock gene period 1 in rat hippocampus.** *J Neuroendocrinol* 2010, **22**(10):1093-1100.
101. Sarabdjitsingh RA, Conway-Campbell BL, Leggett JD, Waite EJ, Meijer OC, de Kloet ER, Lightman SL: **Stress responsiveness varies over the ultradian glucocorticoid cycle in a brain-region-specific manner.** *Endocrinology* 2010, **151**(11):5369-5379.
102. Lightman SL, Conway-Campbell BL: **The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration.** *Nat Rev Neurosci* 2010, **11**(10):710-718.
103. Spiga F, Knight DM, Droste SK, Conway-Campbell B, Kershaw Y, MacSweeney CP, Thomson FJ, Craighead M, Peeters BW, Lightman SL: **Differential effect of glucocorticoid receptor antagonists on glucocorticoid receptor nuclear translocation and DNA binding.** *J Psychopharmacol* 2011, **25**(2):211-221.
104. Meyer JS: **Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues.** *Physiol Rev* 1985, **65**(4):946-1020.
105. Baker ME, Funder JW, Kattoula SR: **Evolution of hormone selectivity in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013, **137**:57-70.

106. Carroll SM, Ortlund EA, Thornton JW: **Mechanisms for the evolution of a derived function in the ancestral glucocorticoid receptor.** *PLoS Genet* 2011, **7**(6):e1002117.
107. Ohtake M, Hattori T, Murase T, Takahashi K, Takatsu M, Miyachi M, Watanabe S, Cheng XW, Murohara T, Nagata K: **Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors in adrenalectomized Dahl salt-sensitive rats.** *Nagoya J Med Sci* 2014, **76**(1-2):59-72.
108. Huesler C, Lauterburg M, Frey BM, Frey FJ: **Evidence for glucocorticoid-mediated hypertension after uninephrectomy.** *Physiol Rep* 2013, **1**(5):e00101.
109. Frey FJ, Odermatt A, Frey BM: **Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004, **13**(4):451-458.
110. Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A: **Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat.** *Neuroendocrinology* 1989, **50**(5):597-604.
111. Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Härfstrand A, Wikstrom AC, Okret S, Zoli M, Miller LS, Greene JL, Gustafsson JA: **Studies on the cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor and estrogen receptor immunoreactivity in the central nervous system of the rat and their relationship to the monoaminergic and peptidergic neurons of the brain.** *J Steroid Biochem* 1987, **27**(1-3):159-170.

112. Meaney MJ, Sapolsky RM, McEwen BS: **The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. II. An autoradiographic study.** *Brain Res* 1985, **350**(1-2):165-168.
113. De Kloet ER, Reul JM: **Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems.** *Psychoneuroendocrinology* 1987, **12**(2):83-105.
114. Reul JM, de Kloet ER: **Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.** *Endocrinology* 1985, **117**(6):2505-2511.
115. Reul JM, de Kloet ER: **Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis.** *J Steroid Biochem* 1986, **24**(1):269-272.
116. Arango-Lievano M, Lambert WM, Jeanneteau F: **Molecular Biology of Glucocorticoid Signaling.** *Adv Exp Med Biol* 2015, **872**:33-57.
117. McEwen BS, Nasca C, Gray JD: **Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex.** *Neuropsychopharmacology* 2015.
118. Caratti G, Matthews L, Poolman T, Kershaw S, Baxter M, Ray D: **Glucocorticoid receptor function in health and disease.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015.
119. Nicolaidis NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E: **Stress, the stress system and the role of glucocorticoids.** *Neuroimmunomodulation* 2015, **22**(1-2):6-19.

120. Dobráková M, Kvetnanský R, Oprsalová Z, Macho L: **[The effect of chronic stress on the activity of the sympathetic-adrenomedullary system]**. *Bratisl Lek Listy* 1990, **91**(8):587-592.
121. Rasia-Filho AA: **Is there anything "autonomous" in the nervous system?** *Adv Physiol Educ* 2006, **30**(1):9-12.
122. Porges SW: **Vagal tone: a physiologic marker of stress vulnerability.** *Pediatrics* 1992, **90**(3 Pt 2):498-504.
123. de Weerth C, Buitelaar JK: **Physiological stress reactivity in human pregnancy--a review.** *Neurosci Biobehav Rev* 2005, **29**(2):295-312.
124. Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MA, Blokhuis HJ: **Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology.** *Neurosci Biobehav Rev* 1999, **23**(7):925-935.
125. De Miguel Z, Vegas O, Garmendia L, Arregi A, Beitia G, Azpiroz A: **Behavioral coping strategies in response to social stress are associated with distinct neuroendocrine, monoaminergic and immune response profiles in mice.** *Behav Brain Res* 2011, **225**(2):554-561.
126. Bowes L, Jaffee SR: **Biology, genes, and resilience: toward a multidisciplinary approach.** *Trauma Violence Abuse* 2013, **14**(3):195-208.
127. Sinha R, Talih M, Malison R, Cooney N, Anderson GM, Kreek MJ: **Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states.** *Psychopharmacology (Berl)* 2003, **170**(1):62-72.
128. Buske-Kirschbaum A, Geiben A, Höllig H, Morschhäuser E, Hellhammer D: **Altered responsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the**

- sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**(9):4245-4251.
129. Pérez-Tejada J, Arregi A, Gómez-Lázaro E, Vegas O, Azpiroz A, Garmendia L: **Coping with chronic social stress in mice: hypothalamic-pituitary-adrenal/sympathetic-adrenal-medullary axis activity, behavioral changes and effects of antalarmin treatment: implications for the study of stress-related psychopathologies.** *Neuroendocrinology* 2013, **98**(1):73-88.
130. Lundberg U: **Coping with Stress: Neuroendocrine Reactions and Implications for Health.** *Noise Health* 1999, **1**(4):67-74.
131. Goldstein DS: **Differential responses of components of the autonomic nervous system.** *Handb Clin Neurol* 2013, **117**:13-22.
132. Chrousos GP, Gold PW: **The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis.** *JAMA* 1992, **267**(9):1244-1252.
133. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW: **Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis.** *Neurosci Biobehav Rev* 1992, **16**(2):115-130.
134. Dünser MW, Hasibeder WR: **Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress.** *J Intensive Care Med* 2009, **24**(5):293-316.
135. Van Bockstaele EJ, Valentino RJ: **Neuropeptide regulation of the locus coeruleus and opiate-induced plasticity of stress responses.** *Adv Pharmacol* 2013, **68**:405-420.
136. Likhtik E, Paz R: **Amygdala-prefrontal interactions in (mal)adaptive learning.** *Trends Neurosci* 2015.

137. Duvarci S, Pare D: **Amygdala microcircuits controlling learned fear.** *Neuron* 2014, **82**(5):966-980.
138. Stamatakis AM, Sparta DR, Jennings JH, McElligott ZA, Decot H, Stuber GD: **Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis circuitry: Implications for addiction-related behaviors.** *Neuropharmacology* 2014, **76 Pt B**:320-328.
139. Toyoda H, Li XY, Wu LJ, Zhao MG, Descalzi G, Chen T, Koga K, Zhuo M: **Interplay of amygdala and cingulate plasticity in emotional fear.** *Neural Plast* 2011, **2011**:813749.
140. Kim MJ, Loucks RA, Palmer AL, Brown AC, Solomon KM, Marchante AN, Whalen PJ: **The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety.** *Behav Brain Res* 2011, **223**(2):403-410.
141. Kvetnansky R, Lu X, Ziegler MG: **Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems.** *Adv Pharmacol* 2013, **68**:359-397.
142. Kormos V, Gaszner B: **Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans.** *Neuropeptides* 2013, **47**(6):401-419.
143. Bali A, Singh N, Jaggi AS: **Neuropeptides as therapeutic targets to combat stress-associated behavioral and neuroendocrinological effects.** *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014, **13**(2):347-368.
144. Eiden LE: **Neuropeptide-catecholamine interactions in stress.** *Adv Pharmacol* 2013, **68**:399-404.
145. Vargas-Martínez F, Uvnäs-Moberg K, Petersson M, Olausson HA, Jiménez-Estrada I: **Neuropeptides as neuroprotective agents: Oxytocin a forefront developmental player in the mammalian brain.** *Prog Neurobiol* 2014, **123C**:37-78.

146. Ballieux RE: **The mind and the immune system.** *Theor Med* 1994, **15**(4):387-395.
147. Mahbub-E-Sobhani, Haque N, Salma U, Ahmed A: **Immune modulation in response to stress and relaxation.** *Pak J Biol Sci* 2011, **14**(6):363-374.
148. Grippo AJ, Scotti MA: **Stress and neuroinflammation.** *Mod Trends Pharmacopsychiatri* 2013, **28**:20-32.
149. Kastin AJ, Banks WA, Zadina JE: **A decade of changing perceptions about neuropeptides.** *Ann N Y Acad Sci* 1990, **579**:1-7.
150. Xiong F, Zhang L: **Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease.** *Front Neuroendocrinol* 2013, **34**(1):27-46.
151. Grace CE, Kim SJ, Rogers JM: **Maternal influences on epigenetic programming of the developing hypothalamic-pituitary-adrenal axis.** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011, **91**(8):797-805.
152. Crofton EJ, Zhang Y, Green TA: **Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment.** *Neurosci Biobehav Rev* 2014, **49C**:19-31.
153. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T: **Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents.** *Front Neurosci* 2014, **8**:166.
154. Cockrem JF: **Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals.** *Gen Comp Endocrinol* 2013, **181**:45-58.
155. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF: **The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner.** *Mol Psychiatry* 2013, **18**(6):666-673.

156. Fujimoto T, Kubo K, Nishikawa Y, Aou S: **Brief neonatal handling alters sexually dimorphic behaviors in adult rats.** *J Integr Neurosci* 2014, **13**(1):61-70.
157. Bernardi JR, Ferreira CF, Senter G, Krolow R, de Aguiar BW, Portella AK, Kauer-Sant'anna M, Kapczinski F, Dalmaz C, Goldani MZ *et al*: **Early life stress interacts with the diet deficiency of omega-3 fatty acids during the life course increasing the metabolic vulnerability in adult rats.** *PLoS One* 2013, **8**(4):e62031.
158. Diehl LA, Alvares LO, Noschang C, Engelke D, Andreazza AC, Gonçalves CA, Quillfeldt JA, Dalmaz C: **Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: effects on memory and hippocampal oxidative stress.** *Neurochem Res* 2012, **37**(4):700-707.
159. Marcolin MeL, Benitz AeN, Arcego DM, Noschang C, Krolow R, Dalmaz C: **Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats.** *Physiol Behav* 2012, **106**(4):491-498.
160. Noschang CG, Krolow R, Fontella FU, Arcego DM, Diehl LA, Weis SN, Arteni NS, Dalmaz C: **Neonatal handling impairs spatial memory and leads to altered nitric oxide production and DNA breaks in a sex specific manner.** *Neurochem Res* 2010, **35**(7):1083-1091.
161. Noschang C, Krolow R, Arcego DM, Toniazzo AP, Huffell AP, Dalmaz C: **Neonatal handling affects learning, reversal learning and antioxidant enzymes activities in a sex-specific manner in rats.** *Int J Dev Neurosci* 2012, **30**(4):285-291.
162. Noschang C, Krolow R, Arcego DM, Laureano D, Fitarelli LD, Huffell AP, Ferreira AG, da Cunha AA, Machado FR, Wyse AT *et al*: **The influence of**

- early life interventions on olfactory memory related to palatable food, and on oxidative stress parameters and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the hippocampus and olfactory bulb of female adult rats.** *Neurochem Res* 2012, **37**(8):1801-1810.
163. Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS, Dalmaz C, Wyse AT, Netto CA: **Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria.** *Mitochondrion* 2012, **12**(2):271-279.
164. Levine S: **Infantile experience and resistance to physiological stress.** *Science* 1957, **126**(3270):405.
165. Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, Sarrieau A: **The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life.** *Psychoneuroendocrinology* 1991, **16**(1-3):85-103.
166. Bernardi JR, Ferreira CF, Nunes M, da Silva CH, Bosa VL, Silveira PP, Goldani MZ: **Impact of Perinatal Different Intrauterine Environments on Child Growth and Development in the First Six Months of Life--IVAPSA Birth Cohort: rationale, design, and methods.** *BMC Pregnancy Childbirth* 2012, **12**:25.
167. Sánchez MM, Ladd CO, Plotsky PM: **Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models.** *Dev Psychopathol* 2001, **13**(3):419-449.
168. Rilling JK, Young LJ: **The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development.** *Science* 2014, **345**(6198):771-776.

169. Stoesz BM, Hare JF, Snow WM: **Neurophysiological mechanisms underlying affiliative social behavior: insights from comparative research.** *Neurosci Biobehav Rev* 2013, **37**(2):123-132.
170. Reynolds LP, Caton JS: **Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity.** *Mol Cell Endocrinol* 2012, **354**(1-2):54-59.
171. Nathanielsz PW: **Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases.** *ILAR J* 2006, **47**(1):73-82.
172. Galjaard S, Devlieger R, Van Assche FA: **Fetal growth and developmental programming.** *J Perinat Med* 2013, **41**(1):101-105.
173. Aiken CE, Ozanne SE: **Transgenerational developmental programming.** *Hum Reprod Update* 2014, **20**(1):63-75.
174. Hofer MA: **Early relationships as regulators of infant physiology and behavior.** *Acta Paediatr Suppl* 1994, **397**:9-18.
175. Bilbo SD, Schwarz JM: **The immune system and developmental programming of brain and behavior.** *Front Neuroendocrinol* 2012, **33**(3):267-286.
176. Bilbo SD, Schwarz JM: **Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system.** *Front Behav Neurosci* 2009, **3**:14.
177. Resendez SL, Kuhnmuensch M, Krzywosinski T, Aragona BJ: **κ -Opioid receptors within the nucleus accumbens shell mediate pair bond maintenance.** *J Neurosci* 2012, **32**(20):6771-6784.
178. Chu Sin Chung P, Kieffer BL: **Delta opioid receptors in brain function and diseases.** *Pharmacol Ther* 2013, **140**(1):112-120.

179. Lutz PE, Kieffer BL: **Opioid receptors: distinct roles in mood disorders.** *Trends Neurosci* 2013, **36**(3):195-206.
180. de Almeida RM, Ferreira A, Agrati D: **Sensory, hormonal, and neural basis of maternal aggression in rodents.** *Curr Top Behav Neurosci* 2014, **17**:111-130.
181. Bridges RS: **Neuroendocrine regulation of maternal behavior.** *Front Neuroendocrinol* 2014.
182. Dinces SM, Romeo RD, McEwen BS, Tang AC: **Enhancing offspring hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) regulation via systematic novelty exposure: the influence of maternal HPA function.** *Front Behav Neurosci* 2014, **8**:204.
183. Fodor A, Tímár J, Zelena D: **Behavioral effects of perinatal opioid exposure.** *Life Sci* 2014, **104**(1-2):1-8.
184. Kaffman A, Meaney MJ: **Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights.** *J Child Psychol Psychiatry* 2007, **48**(3-4):224-244.
185. Hennessy MB, Deak T, Schiml-Webb PA: **Early attachment-figure separation and increased risk for later depression: potential mediation by proinflammatory processes.** *Neurosci Biobehav Rev* 2010, **34**(6):782-790.
186. Champagne F, Meaney MJ: **Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity.** *Prog Brain Res* 2001, **133**:287-302.
187. Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C: **Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents.** *Neurosci Biobehav Rev* 2005, **29**(8):1335-1346.

188. Kikusui T, Mori Y: **Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents.** *J Neuroendocrinol* 2009, **21**(4):427-431.
189. Champagne FA: **Early environments, glucocorticoid receptors, and behavioral epigenetics.** *Behav Neurosci* 2013, **127**(5):628-636.
190. Benetti F, Andrade de Araujo P, Sanvitto GL, Lucion AB: **Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats.** *Dev Psychobiol* 2007, **49**(3):258-264.
191. Plotsky PM, Meaney MJ: **Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats.** *Brain Res Mol Brain Res* 1993, **18**(3):195-200.
192. Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW: **Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation.** *Neurosci Res* 2007, **58**(1):32-39.
193. Carlyle BC, Duque A, Kitchen RR, Bordner KA, Coman D, Doolittle E, Papademetris X, Hyder F, Taylor JR, Simen AA: **Maternal separation with early weaning: a rodent model providing novel insights into neglect associated developmental deficits.** *Dev Psychopathol* 2012, **24**(4):1401-1416.
194. George ED, Bordner KA, Elwafi HM, Simen AA: **Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect.** *BMC Neurosci* 2010, **11**:123.
195. Matthews K, Wilkinson LS, Robbins TW: **Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood.** *Physiol Behav* 1996, **59**(1):99-107.

196. Villescas R, Bell RW, Wright L, Kufner M: **Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest.** *Dev Psychobiol* 1977, **10**(4):323-329.
197. Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS: **Animal models of anxiety disorders and stress.** *Rev Bras Psiquiatr* 2013, **35** Suppl 2:S101-111.
198. Meyer U: **Developmental neuroinflammation and schizophrenia.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013, **42**:20-34.
199. Powell SB, Sejnowski TJ, Behrens MM: **Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia.** *Neuropharmacology* 2012, **62**(3):1322-1331.
200. Miyagawa K, Tsuji M, Fujimori K, Takeda H: **[Update on epigenetic regulation in pathophysiologies of stress-induced psychiatric disorders].** *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2010, **30**(4):153-160.
201. Walker SC, McGlone FP: **The social brain: neurobiological basis of affiliative behaviours and psychological well-being.** *Neuropeptides* 2013, **47**(6):379-393.
202. Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas JM: **Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models.** *Neurosci Biobehav Rev* 2011, **35**(8):1713-1721.
203. Sachser N, Hennessy MB, Kaiser S: **Adaptive modulation of behavioural profiles by social stress during early phases of life and adolescence.** *Neurosci Biobehav Rev* 2011, **35**(7):1518-1533.
204. Varlinskaya EI, Vetter-O'Hagen CS, Spear LP: **Puberty and gonadal hormones: role in adolescent-typical behavioral alterations.** *Horm Behav* 2013, **64**(2):343-349.

205. Middleton FA, Varlinskaya EI, Mooney SM: **Molecular substrates of social avoidance seen following prenatal ethanol exposure and its reversal by social enrichment.** *Dev Neurosci* 2012, **34**(2-3):115-128.
206. Varlinskaya EI, Spear LP: **Differences in the social consequences of ethanol emerge during the course of adolescence in rats: social facilitation, social inhibition, and anxiolysis.** *Dev Psychobiol* 2006, **48**(2):146-161.
207. Varlinskaya EI, Truxell EM, Spear LP: **Repeated restraint stress alters sensitivity to the social consequences of ethanol differentially in early and late adolescent rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 2013, **113**:38-45.
208. Anderson RI, Agoglia AE, Morales M, Varlinskaya EI, Spear LP: **Stress, κ manipulations, and aversive effects of ethanol in adolescent and adult male rats.** *Neuroscience* 2013, **249**:214-222.
209. Varlinskaya EI, Spear LP: **Social interactions in adolescent and adult Sprague-Dawley rats: impact of social deprivation and test context familiarity.** *Behav Brain Res* 2008, **188**(2):398-405.
210. Houenou J, Perlini C, Brambilla P: **Epidemiological and clinical aspects will guide the neuroimaging research in bipolar disorder.** *Epidemiol Psychiatr Sci* 2015:1-4.
211. Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B: **Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia.** *Mol Psychiatry* 1999, **4**(2):163-172.

212. Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ: **Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates.** *Neurosci Biobehav Rev* 2009, **33**(4):573-585.
213. Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, Santin A, Kapczinski F: **Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes.** *Neurosci Lett* 2006, **398**(3):215-219.
214. Fernandes BS, Gama CS, Ceresér KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, de Lucena D, Kunz M, Gomes FA, Kapczinski F: **Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis.** *J Psychiatr Res* 2011, **45**(8):995-1004.
215. Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F: **Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania.** *Life Sci* 2006, **79**(3):281-286.
216. Frey BN, Andreazza AC, Houenou J, Jamain S, Goldstein BI, Frye MA, Leboyer M, Berk M, Malhi GS, Lopez-Jaramillo C *et al*: **Biomarkers in bipolar disorder: A positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force.** *Aust N Z J Psychiatry* 2013.
217. Grande I, Kapczinski F, Stertz L, Colpo GD, Kunz M, Cereser KM, Kauer-Sant'Anna M, Frey B, Vieta E, Magalhaes PV: **Peripheral brain-derived neurotrophic factor changes along treatment with extended release quetiapine during acute mood episodes: an open-label trial in drug-free patients with bipolar disorder.** *J Psychiatr Res* 2012, **46**(11):1511-1514.

218. Kapczinski F, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M, Grassi-Oliveira R: **Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder.** *Expert Rev Neurother* 2008, **8**(7):1101-1113.
219. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN: **Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2009, **12**(4):447-458.
220. Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, Souza DO, Portela LV, Gentil V: **Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode.** *Biol Psychiatry* 2007, **61**(2):142-144.
221. Ruiz de Azua S, Matute C, Stertz L, Mosquera F, Palomino A, de la Rosa I, Barbeito S, Vega P, Kapczinski F, González-Pinto A: **Plasma brain-derived neurotrophic factor levels, learning capacity and cognition in patients with first episode psychosis.** *BMC Psychiatry* 2013, **13**:27.
222. Scola G, Andreazza AC: **The role of neurotrophins in bipolar disorder.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015, **56C**:122-128.
223. Manji HK, Drevets WC, Charney DS: **The cellular neurobiology of depression.** *Nat Med* 2001, **7**(5):541-547.
224. Park H, Poo MM: **Neurotrophin regulation of neural circuit development and function.** *Nat Rev Neurosci* 2013, **14**(1):7-23.
225. Poo MM: **Neurotrophins as synaptic modulators.** *Nat Rev Neurosci* 2001, **2**(1):24-32.

226. Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H: **Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family.** *Neuron* 1990, **5**(4):511-526.
227. Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Dwivedi Y: **Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2008, **11**(8):1047-1061.
228. Yoshimura R, Nakano Y, Hori H, Ikenouchi A, Ueda N, Nakamura J: **Effect of risperidone on plasma catecholamine metabolites and brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorders.** *Hum Psychopharmacol* 2006, **21**(7):433-438.
229. Phillips ML, Kupfer DJ: **Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions.** *Lancet* 2013, **381**(9878):1663-1671.
230. Maletic V, Raison C: **Integrated neurobiology of bipolar disorder.** *Front Psychiatry* 2014, **5**:98.
231. Bücker J, Kapczinski F, Post R, Ceresér KM, Szobot C, Yatham LN, Kapczinski NS, Kauer-Sant'Anna M: **Cognitive impairment in school-aged children with early trauma.** *Compr Psychiatry* 2012, **53**(6):758-764.
232. Kauer-Sant'Anna M, Tramontina J, Andreazza AC, Cereser K, da Costa S, Santin A, Yatham LN, Kapczinski F: **Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology.** *Bipolar Disord* 2007, **9 Suppl 1**:128-135.
233. Tramontina JF, Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, Kapczinski F: **Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania.** *Neurosci Lett* 2009, **452**(2):111-113.

234. Gonen T, Sharon H, Pearlson G, Hendler T: **Moods as ups and downs of the motivation pendulum: revisiting reinforcement sensitivity theory (RST) in bipolar disorder.** *Front Behav Neurosci* 2014, **8**:378.
235. Whitton AE, Treadway MT, Pizzagalli DA: **Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia.** *Curr Opin Psychiatry* 2015, **28**(1):7-12.
236. Nusslock R, Young CB, Damme KS: **Elevated reward-related neural activation as a unique biological marker of bipolar disorder: assessment and treatment implications.** *Behav Res Ther* 2014, **62**:74-87.
237. Howes O, McCutcheon R, Stone J: **Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century.** *J Psychopharmacol* 2015.
238. Overstreet DH: **Modeling depression in animal models.** *Methods Mol Biol* 2012, **829**:125-144.
239. McElroy SL, Kotwal R, Keck PE, Akiskal HS: **Comorbidity of bipolar and eating disorders: distinct or related disorders with shared dysregulations?** *J Affect Disord* 2005, **86**(2-3):107-127.
240. Mury M, Verdoux H, Bourgeois M: **[Comorbidity of bipolar and eating disorders. Epidemiologic and therapeutic aspects].** *Encephale* 1995, **21**(5):545-553.
241. Fakra E, Belzeaux R, Azorin JM, Adida M: **[Affective disorders and eating disorders].** *Encephale* 2014, **40 Suppl 3**:S46-50.
242. Campos RN, Dos Santos DJ, Cordás TA, Angst J, Moreno RA: **Occurrence of bipolar spectrum disorder and comorbidities in women with eating disorders.** *Int J Bipolar Disord* 2013, **1**:25.

243. Jen A, Saunders EF, Ornstein RM, Kamali M, McInnis MG: **Impulsivity, anxiety, and alcohol misuse in bipolar disorder comorbid with eating disorders.** *Int J Bipolar Disord* 2013, **1**:13.
244. Seixas C, Miranda-Scippa A, Nery-Fernandes F, Andrade-Nascimento M, Quarantini LC, Kapczinski F, Oliveira IR: **Prevalence and clinical impact of eating disorders in bipolar patients.** *Rev Bras Psiquiatr* 2012, **34**(1):66-70.
245. Wildes JE, Marcus MD, Fagiolini A: **Prevalence and correlates of eating disorder co-morbidity in patients with bipolar disorder.** *Psychiatry Res* 2008, **161**(1):51-58.
246. Wildes JE, Marcus MD, Fagiolini A: **Eating disorders and illness burden in patients with bipolar spectrum disorders.** *Compr Psychiatry* 2007, **48**(6):516-521.
247. Bernstein EE, Nierenberg AA, Deckersbach T, Sylvia LG: **Eating behavior and obesity in bipolar disorder.** *Aust N Z J Psychiatry* 2015.
248. Wildes JE, Marcus MD, Fagiolini A: **Obesity in patients with bipolar disorder: a biopsychosocial-behavioral model.** *J Clin Psychiatry* 2006, **67**(6):904-915.
249. Cermolacce M, Belzeaux R, Adida M, Azorin JM: **[Affective disorders: endocrine and metabolic comorbidities].** *Encephale* 2014, **40** Suppl 3:S33-39.
250. Hallahan B, Garland MR: **Essential fatty acids and mental health.** *Br J Psychiatry* 2005, **186**:275-277.
251. Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M: **Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties.** *J Am Coll Nutr* 2004, **23**(4):281-302.

252. Pelliccia F, Marazzi G, Greco C, Franzoni F, Speziale G, Gaudio C: **Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs.** *Int J Cardiol* 2013, **170**(2 Suppl 1):S3-7.
253. Burr GO, Burr MM: **Nutrition classics from The Journal of Biological Chemistry 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet.** *Nutr Rev* 1973, **31**(8):248-249.
254. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A: **Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011, **155**(2):117-130.
255. Bazinet RP, Layé S: **Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease.** *Nat Rev Neurosci* 2014, **15**(12):771-785.
256. Colussi G, Catena C, Baroselli S, Nadalini E, Lapenna R, Chiuch A, Sechi LA: **Omega-3 fatty acids: from biochemistry to their clinical use in the prevention of cardiovascular disease.** *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007, **2**(1):13-21.
257. **The nomenclature of lipids. Recommendations (1976) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature.** *Lipids* 1977, **12**(6):455-468.
258. Kaur N, Chugh V, Gupta AK: **Essential fatty acids as functional components of foods- a review.** *J Food Sci Technol* 2014, **51**(10):2289-2303.
259. Denis I, Potier B, Heberden C, Vancassel S: **ω -3 polyunsaturated fatty acids and brain aging.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014.
260. Rombaldi Bernardi J, de Souza Escobar R, Ferreira CF, Pelufo Silveira P: **Fetal and neonatal levels of omega-3: effects on neurodevelopment, nutrition, and growth.** *ScientificWorldJournal* 2012, **2012**:202473.

261. Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A: **Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011, **155**(3):195-218.
262. Leonard WR, Snodgrass JJ, Robertson ML: **Frontiers in Neuroscience**
Evolutionary Perspectives on Fat Ingestion and Metabolism in Humans. In: *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects.* edn. Edited by Montmayeur JP, le Coutre J. Boca Raton (FL): CRC Press
Taylor & Francis Group, LLC; 2010.
263. Gil-Sánchez A, Koletzko B, Larqué E: **Current understanding of placental fatty acid transport.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012, **15**(3):265-272.
264. Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B: **Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta.** *Clin Nutr* 2008, **27**(5):685-693.
265. Berti C, Cetin I, Agostoni C, Desoye G, Devlieger R, Emmett PM, Ensenauer R, Hauner H, Herrera E, Hoesli I *et al*: **Pregnancy and infants' outcome: nutritional and metabolic implications.** *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014.
266. Hashimoto M: **[Omega-3 fatty acids and cognition].** *Nihon Rinsho* 2014, **72**(4):648-656.
267. Denis I, Potier B, Vancassel S, Heberden C, Lavialle M: **Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: body of evidence and possible mechanisms.** *Ageing Res Rev* 2013, **12**(2):579-594.
268. Youdim KA, Martin A, Joseph JA: **Essential fatty acids and the brain: possible health implications.** *Int J Dev Neurosci* 2000, **18**(4-5):383-399.

269. Tanaka K, Farooqui AA, Siddiqi NJ, Alhomida AS, Ong WY: **Effects of docosahexaenoic Acid on neurotransmission.** *Biomol Ther (Seoul)* 2012, **20**(2):152-157.
270. Kaduce TL, Chen Y, Hell JW, Spector AA: **Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons.** *J Neurochem* 2008, **105**(4):1525-1535.
271. Spector AA, Yorek MA: **Membrane lipid composition and cellular function.** *J Lipid Res* 1985, **26**(9):1015-1035.
272. Janssen CI, Kiliaan AJ: **Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration.** *Prog Lipid Res* 2014, **53**:1-17.
273. Salvati S, Natali F, Attorri L, Di Benedetto R, Leonardi F, Di Biase A, Ferri F, Fortuna S, Lorenzini P, Sanchez M *et al*: **Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain.** *J Neurosci Res* 2008, **86**(4):776-784.
274. Georgieff MK: **Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement.** *Am J Clin Nutr* 2007, **85**(2):614S-620S.
275. Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PR: **Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids.** *Lipids* 2003, **38**(4):391-398.
276. Williams CM, Burdge G: **Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources.** *Proc Nutr Soc* 2006, **65**(1):42-50.
277. Martins DA, Custódio L, Barreira L, Pereira H, Ben-Hamadou R, Varela J, Abu-Salah KM: **Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae.** *Mar Drugs* 2013, **11**(7):2259-2281.

278. Haggarty P: **Meeting the fetal requirement for polyunsaturated fatty acids in pregnancy.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014, **17**(2):151-155.
279. Simopoulos AP: **Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids.** *Poult Sci* 2000, **79**(7):961-970.
280. Simopoulos AP, Leaf A, Salem N: **Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids.** *J Am Coll Nutr* 1999, **18**(5):487-489.
281. Leaf A, Weber PC: **A new era for science in nutrition.** *Am J Clin Nutr* 1987, **45**(5 Suppl):1048-1053.
282. Sprecher H: **Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1486**(2-3):219-231.
283. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ: **Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids.** *Prog Lipid Res* 2014, **53**:124-144.
284. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ: **Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids.** *Prog Lipid Res* 2013, **53C**:124-144.
285. Nakamura MT, Nara TY: **Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003, **68**(2):145-150.
286. Nakamura H, Murayama T: **Role of sphingolipids in arachidonic acid metabolism.** *J Pharmacol Sci* 2014, **124**(3):307-312.
287. Ooi EM, Ng TW, Watts GF, Barrett PH: **Dietary fatty acids and lipoprotein metabolism: new insights and updates.** *Curr Opin Lipidol* 2013, **24**(3):192-197.
288. Brenna JT: **Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002, **5**(2):127-132.

289. Molloy C, Doyle LW, Makrides M, Anderson PJ: **Docosahexaenoic acid and visual functioning in preterm infants: a review.** *Neuropsychol Rev* 2012, **22**(4):425-437.
290. Lien EL, Hammond BR: **Nutritional influences on visual development and function.** *Prog Retin Eye Res* 2011, **30**(3):188-203.
291. Lien EL: **Toxicology and safety of DHA.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009, **81**(2-3):125-132.
292. Noaghiul S, Hibbeln JR: **Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders.** *Am J Psychiatry* 2003, **160**(12):2222-2227.
293. Hibbeln JR: **Fish consumption and major depression.** *Lancet* 1998, **351**(9110):1213.
294. Hibbeln JR: **Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: a cross-national, ecological analysis.** *J Affect Disord* 2002, **69**(1-3):15-29.
295. Golding J, Steer C, Emmett P, Davis JM, Hibbeln JR: **High levels of depressive symptoms in pregnancy with low omega-3 fatty acid intake from fish.** *Epidemiology* 2009, **20**(4):598-603.
296. Hibbeln JR: **Depression, suicide and deficiencies of omega-3 essential fatty acids in modern diets.** *World Rev Nutr Diet* 2009, **99**:17-30.
297. Chiu CC, Huang SY, Chen CC, Su KP: **Omega-3 fatty acids are more beneficial in the depressive phase than in the manic phase in patients with bipolar I disorder.** *J Clin Psychiatry* 2005, **66**(12):1613-1614.
298. Chiu CC, Huang SY, Su KP, Lu ML, Huang MC, Chen CC, Shen WW: **Polyunsaturated fatty acid deficit in patients with bipolar mania.** *Eur Neuropsychopharmacol* 2003, **13**(2):99-103.

299. Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, Wagh UV, Debsikdar VB, Mahadik SP: **Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients.** *Psychiatry Res* 2003, **121**(2):109-122.
300. Sarris J, Mischoulon D, Schweitzer I: **Omega-3 for bipolar disorder: meta-analyses of use in mania and bipolar depression.** *J Clin Psychiatry* 2012, **73**(1):81-86.
301. Balanzá-Martínez V, Fries GR, Colpo GD, Silveira PP, Portella AK, Tabarés-Seisdedos R, Kapczinski F: **Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder.** *Expert Rev Neurother* 2011, **11**(7):1029-1047.
302. Murphy BL, Stoll AL, Harris PQ, Ravichandran C, Babb SM, Carlezon WA, Cohen BM: **Omega-3 fatty acid treatment, with or without cytidine, fails to show therapeutic properties in bipolar disorder: a double-blind, randomized add-on clinical trial.** *J Clin Psychopharmacol* 2012, **32**(5):699-703.
303. Freeman MP, Hibbeln JR, Wisner KL, Davis JM, Mischoulon D, Peet M, Keck PE, Marangell LB, Richardson AJ, Lake J *et al*: **Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry.** *J Clin Psychiatry* 2006, **67**(12):1954-1967.
304. Dager SR, Friedman SD, Parow A, Demopulos C, Stoll AL, Lyoo IK, Dunner DL, Renshaw PF: **Brain metabolic alterations in medication-free patients with bipolar disorder.** *Arch Gen Psychiatry* 2004, **61**(5):450-458.
305. Locke CA, Stoll AL: **Omega-3 fatty acids in major depression.** *World Rev Nutr Diet* 2001, **89**:173-185.

306. Stoll AL, Damico KE, Daly BP, Severus WE, Marangell LB: **Methodological considerations in clinical studies of omega 3 fatty acids in major depression and bipolar disorder.** *World Rev Nutr Diet* 2001, **88**:58-67.
307. Tohen M, Hennen J, Zarate CM, Baldessarini RJ, Strakowski SM, Stoll AL, Faedda GL, Suppes T, Gebre-Medhin P, Cohen BM: **Two-year syndromal and functional recovery in 219 cases of first-episode major affective disorder with psychotic features.** *Am J Psychiatry* 2000, **157**(2):220-228.
308. Stoll AL, Locke CA, Marangell LB, Severus WE: **Omega-3 fatty acids and bipolar disorder: a review.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999, **60**(5-6):329-337.
309. Stoll AL, Severus WE, Freeman MP, Rueter S, Zboyan HA, Diamond E, Cress KK, Marangell LB: **Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial.** *Arch Gen Psychiatry* 1999, **56**(5):407-412.
310. Stoll AL, Sachs GS, Cohen BM, Lafer B, Christensen JD, Renshaw PF: **Choline in the treatment of rapid-cycling bipolar disorder: clinical and neurochemical findings in lithium-treated patients.** *Biol Psychiatry* 1996, **40**(5):382-388.
311. Frangou S, Lewis M, Wollard J, Simmons A: **Preliminary in vivo evidence of increased N-acetyl-aspartate following eicosapentanoic acid treatment in patients with bipolar disorder.** *J Psychopharmacol* 2007, **21**(4):435-439.
312. Frangou S, Lewis M, McCrone P: **Efficacy of ethyl-eicosapentaenoic acid in bipolar depression: randomised double-blind placebo-controlled study.** *Br J Psychiatry* 2006, **188**:46-50.

313. McNamara RK, Strimpfel J, Jandacek R, Rider T, Tso P, Welge JA, Strawn JR, Delbello MP: **Detection and Treatment of Long-Chain Omega-3 Fatty Acid Deficiency in Adolescents with SSRI-Resistant Major Depressive Disorder.** *PharmaNutrition* 2014, **2**(2):38-46.
314. DeMar JC, DiMartino C, Baca AW, Lefkowitz W, Salem N: **Effect of dietary docosahexaenoic acid on biosynthesis of docosahexaenoic acid from alpha-linolenic acid in young rats.** *J Lipid Res* 2008, **49**(9):1963-1980.
315. Mathieu G, Oualian C, Denis I, Lavialle M, Gisquet-Verrier P, Vancassel S: **Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation together with early maternal separation increases anxiety and vulnerability to stress in adult rats.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011, **85**(3-4):129-136.
316. Mathieu G, Denis S, Lavialle M, Vancassel S: **Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008, **78**(6):391-401.
317. Clarke G, O'Mahony SM, Hennessy AA, Ross P, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG: **Chain reactions: early-life stress alters the metabolic profile of plasma polyunsaturated fatty acids in adulthood.** *Behav Brain Res* 2009, **205**(1):319-321.
318. Catalan J, Moriguchi T, Slotnick B, Murthy M, Greiner RS, Salem N: **Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats.** *Behav Neurosci* 2002, **116**(6):1022-1031.
319. Chalon S: **Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006, **75**(4-5):259-269.

320. Fedorova I, Hussein N, Baumann MH, Di Martino C, Salem N: **An n-3 fatty acid deficiency impairs rat spatial learning in the Barnes maze.** *Behav Neurosci* 2009, **123**(1):196-205.
321. Fedorova I, Hussein N, Di Martino C, Moriguchi T, Hoshiba J, Majchrzak S, Salem N: **An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007, **77**(5-6):269-277.
322. Fedorova I, Salem N, Jr.: **Omega-3 fatty acids and rodent behavior.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006, **75**(4-5):271-289.
323. Moriguchi T, Greiner RS, Salem N: **Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration.** *J Neurochem* 2000, **75**(6):2563-2573.
324. Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, Durand G, Chalon S: **The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids.** *Am J Clin Nutr* 2002, **75**(4):662-667.
325. Zimmer L, Delion-Vancassel S, Durand G, Guilloteau D, Bodard S, Besnard JC, Chalon S: **Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids.** *J Lipid Res* 2000, **41**(1):32-40.
326. Zimmer L, Hembert S, Durand G, Breton P, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S: **Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study.** *Neurosci Lett* 1998, **240**(3):177-181.

327. Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC, Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP: **n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism.** *Mol Psychiatry* 2007, **12**(1):36-46.
328. Rapoport SI, Rao JS, Igarashi M: **Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007, **77**(5-6):251-261.
329. Logan AC: **Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression.** *Altern Med Rev* 2003, **8**(4):410-425.
330. Bloch MH, Hannestad J: **Omega-3 fatty acids for the treatment of depression: systematic review and meta-analysis.** *Mol Psychiatry* 2012, **17**(12):1272-1282.
331. Grosso G, Pajak A, Marventano S, Castellano S, Galvano F, Bucolo C, Drago F, Caraci F: **Role of omega-3 fatty acids in the treatment of depressive disorders: a comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials.** *PLoS One* 2014, **9**(5):e96905.
332. Sublette ME, Ellis SP, Geant AL, Mann JJ: **Meta-analysis of the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in clinical trials in depression.** *J Clin Psychiatry* 2011, **72**(12):1577-1584.
333. Cheng A, Hou Y, Mattson MP: **Mitochondria and neuroplasticity.** *ASN Neuro* 2010, **2**(5):e00045.
334. Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A: **Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders.** *Neuron* 2008, **60**(5):748-766.
335. Mattson MP: **Calcium and neurodegeneration.** *Aging Cell* 2007, **6**(3):337-350.

336. Boveris A, Oshino N, Chance B: **The cellular production of hydrogen peroxide.** *Biochem J* 1972, **128**(3):617-630.
337. Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP: **The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**(6):747-752.
338. Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M: **The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses.** *Cell* 2004, **119**(6):873-887.
339. Brusco J, Haas K: **Interactions between mitochondria and MEF2 regulate neuronal structural and functional plasticity and metaplasticity.** *J Physiol* 2015.
340. Hroudová J, Singh N, Fišar Z: **Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease.** *Biomed Res Int* 2014, **2014**:175062.
341. Hroudová J: **Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation.** *Neural Regeneration Research* 2013, **Volume 8**(Issue 4):13.
342. Arnold S: **Cytochrome c oxidase and its role in neurodegeneration and neuroprotection.** *Adv Exp Med Biol* 2012, **748**:305-339.
343. Martin LJ: **Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012, **107**:355-415.
344. Müller WE, Eckert A, Kurz C, Eckert GP, Leuner K: **Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease-therapeutic aspects.** *Mol Neurobiol* 2010, **41**(2-3):159-171.

345. Rodriguez-Enriquez S, Kai Y, Maldonado E, Currin RT, Lemasters JJ: **Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes.** *Autophagy* 2009, **5**(8):1099-1106.
346. DiMauro S, Schon EA: **Mitochondrial disorders in the nervous system.** *Annu Rev Neurosci* 2008, **31**:91-123.
347. Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, Ramsey JJ: **Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling.** *Acta Physiol Scand* 2004, **182**(4):321-331.
348. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeffner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G: **Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis.** *J Exp Med* 1996, **184**(3):1155-1160.
349. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A: **Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies.** *Clin Chim Acta* 1994, **228**(1):35-51.
350. Massaad CA, Klann E: **Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **14**(10):2013-2054.
351. Hidalgo C, Carrasco MA: **Redox control of brain calcium in health and disease.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **14**(7):1203-1207.
352. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: **Mitochondria, oxidants, and aging.** *Cell* 2005, **120**(4):483-495.
353. Fridovich I: **Superoxide radical and superoxide dismutases.** *Annu Rev Biochem* 1995, **64**:97-112.
354. Rajasekaran NS, Connell P, Christians ES, Yan LJ, Taylor RP, Orosz A, Zhang XQ, Stevenson TJ, Peshock RM, Leopold JA *et al*: **Human alpha B-crystallin**

- mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice.** *Cell* 2007, **130**(3):427-439.
355. Jensen PK: **Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation.** *Biochim Biophys Acta* 1966, **122**(2):157-166.
356. Jensen PK: **Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. II. Steroid effects.** *Biochim Biophys Acta* 1966, **122**(2):167-174.
357. Debnath M, Venkatasubramanian G, Berk M: **Fetal programming of schizophrenia: Select mechanisms.** *Neurosci Biobehav Rev* 2015, **49C**:90-104.
358. Rajasekaran A, Venkatasubramanian G, Berk M, Debnath M: **Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications.** *Neurosci Biobehav Rev* 2015, **48C**:10-21.
359. Pagano G, Talamanca AA, Castello G, Cordero MD, d'Ischia M, Gadaleta MN, Pallardó FV, Petrović S, Tiano L, Zatterale A: **Oxidative stress and mitochondrial dysfunction across broad-ranging pathologies: toward mitochondria-targeted clinical strategies.** *Oxid Med Cell Longev* 2014, **2014**:541230.
360. Dumont M, Lin MT, Beal MF: **Mitochondria and antioxidant targeted therapeutic strategies for Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis* 2010, **20** Suppl 2:S633-643.
361. Lin TK, Liou CW, Chen SD, Chuang YC, Tiao MM, Wang PW, Chen JB, Chuang JH: **Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease.** *Chang Gung Med J* 2009, **32**(6):589-599.

362. Lin MT, Beal MF: **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.** *Nature* 2006, **443**(7113):787-795.
363. Kang J, Pervaiz S: **Mitochondria: redox metabolism and dysfunction.** *Biochem Res Int* 2012, **2012**:896751.
364. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD: **Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.** *J Neurochem* 1990, **54**(3):823-827.
365. Bazan NG, Molina MF, Gordon WC: **Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases.** *Annu Rev Nutr* 2011, **31**:321-351.
366. Bazan NG, Musto AE, Knott EJ: **Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity.** *Mol Neurobiol* 2011, **44**(2):216-222.
367. Bazan NG: **Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease.** *J Lipid Res* 2009, **50** Suppl:S400-405.
368. Berman DR, Liu YQ, Barks J, Mozurkewich E: **Docosahexaenoic acid confers neuroprotection in a rat model of perinatal hypoxia-ischemia potentiated by Escherichia coli lipopolysaccharide-induced systemic inflammation.** *Am J Obstet Gynecol* 2010, **202**(5):469.e461-466.
369. Berman DR, Liu Y, Barks J, Mozurkewich E: **Treatment with docosahexaenoic acid after hypoxia-ischemia improves forepaw placing in a rat model of perinatal hypoxia-ischemia.** *Am J Obstet Gynecol* 2010, **203**(4):385.e381-385.

370. Berman DR, Mozurkewich E, Liu Y, Barks J: **Docosahexaenoic acid pretreatment confers neuroprotection in a rat model of perinatal cerebral hypoxia-ischemia.** *Am J Obstet Gynecol* 2009, **200**(3):305.e301-306.
371. Glozman S, Green P, Kamensky B, Weiner L, Yavin E: **Ethyl docosahexaenoic acid administration during intrauterine life enhances prostanoid production and reduces free radicals generation in the fetal rat brain.** *Lipids* 1999, **34 Suppl**:S247-248.
372. Glozman S, Green P, Yavin E: **Intraamniotic ethyl docosahexaenoate administration protects fetal rat brain from ischemic stress.** *J Neurochem* 1998, **70**(6):2484-2491.
373. Feng Z, Zou X, Jia H, Li X, Zhu Z, Liu X, Bucheli P, Balleve O, Hou Y, Zhang W *et al*: **Maternal docosahexaenoic acid feeding protects against impairment of learning and memory and oxidative stress in prenatally stressed rats: possible role of neuronal mitochondria metabolism.** *Antioxid Redox Signal* 2012, **16**(3):275-289.
374. Khairallah RJ, Sparagna GC, Khanna N, O'Shea KM, Hecker PA, Kristian T, Fiskum G, Des Rosiers C, Polster BM, Stanley WC: **Dietary supplementation with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, dramatically alters cardiac mitochondrial phospholipid fatty acid composition and prevents permeability transition.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1797**(8):1555-1562.
375. O'Shea KM, Chess DJ, Khairallah RJ, Hecker PA, Lei B, Walsh K, Des Rosiers C, Stanley WC: **ω -3 Polyunsaturated fatty acids prevent pressure overload-induced ventricular dilation and decrease in mitochondrial enzymes despite no change in adiponectin.** *Lipids Health Dis* 2010, **9**:95.

376. Zeghichi-Hamri S, de Lorgeril M, Salen P, Chibane M, de Leiris J, Boucher F, Laporte F: **Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats.** *Nutr Res* 2010, **30**(12):849-857.
377. Jeng JY, Lee WH, Tsai YH, Chen CY, Chao SY, Hsieh RH: **Functional modulation of mitochondria by eicosapentaenoic acid provides protection against ceramide toxicity to C6 glioma cells.** *J Agric Food Chem* 2009, **57**(24):11455-11462.
378. Kopecky J, Rossmeisl M, Flachs P, Kuda O, Brauner P, Jilkova Z, Stankova B, Tvrzicka E, Bryhn M: **n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function.** *Proc Nutr Soc* 2009, **68**(4):361-369.
379. O'Shea KM, Khairallah RJ, Sparagna GC, Xu W, Hecker PA, Robillard-Frayne I, Des Rosiers C, Kristian T, Murphy RC, Fiskum G *et al*: **Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition.** *J Mol Cell Cardiol* 2009, **47**(6):819-827.
380. Lu J, Caplan MS, Li D, Jilling T: **Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008, **294**(5):G1181-1190.
381. Brenna JT, Diau GY: **The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007, **77**(5-6):247-250.

382. Kaur P, Schulz K, Aschner M, Syversen T: **Role of docosahexaenoic acid in modulating methylmercury-induced neurotoxicity.** *Toxicol Sci* 2007, **100**(2):423-432.
383. Kolar SS, Barhoumi R, Callaway ES, Fan YY, Wang N, Lupton JR, Chapkin RS: **Synergy between docosahexaenoic acid and butyrate elicits p53-independent apoptosis via mitochondrial Ca(2+) accumulation in colonocytes.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **293**(5):G935-943.
384. Serkov IV, Shevtsova EF, Dubova LG, Kireeva EG, Vishnevskaya EM, Gretskeya NM, Bezuglov VV, Bachurin SO: **Interaction of docosahexaenoic acid derivatives with mitochondria.** *Dokl Biol Sci* 2007, **414**:187-189.
385. Eckert GP, Lipka U, Muller WE: **Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013, **88**(1):105-114.
386. Eckert GP, Renner K, Eckert SH, Eckmann J, Hagl S, Abdel-Kader RM, Kurz C, Leuner K, Muller WE: **Mitochondrial dysfunction--a pharmacological target in Alzheimer's disease.** *Mol Neurobiol* 2012, **46**(1):136-150.
387. Al-Gubory KH: **Mitochondria: omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species.** *Int J Biochem Cell Biol* 2012, **44**(9):1569-1573.
388. Bhatia HS, Agrawal R, Sharma S, Huo YX, Ying Z, Gomez-Pinilla F: **Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood.** *PLoS One* 2011, **6**(12):e28451.
389. Ailhaud G, Massiera F, Weill P, Legrand P, Alessandri JM, Guesnet P: **Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity.** *Prog Lipid Res* 2006, **45**(3):203-236.

390. McNamara RK, Carlson SE: **Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006, **75**(4-5):329-349.
391. Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D: **Depletion of docosahexaenoic acid in red blood cell membranes of depressive patients.** *Biochem Soc Trans* 1998, **26**(2):S142.
392. Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D: **Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients.** *J Affect Disord* 1998, **48**(2-3):149-155.
393. Grosso G, Galvano F, Marventano S, Malaguarnera M, Bucolo C, Drago F, Caraci F: **Omega-3 fatty acids and depression: scientific evidence and biological mechanisms.** *Oxid Med Cell Longev* 2014, **2014**:313570.
394. Liperoti R, Landi F, Fusco O, Bernabei R, Onder G: **Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence.** *Curr Pharm Des* 2009, **15**(36):4165-4172.
395. Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ: **The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations.** *J Neuroendocrinol* 2014, **26**(10):707-723.
396. Garoflos E, Stamatakis A, Mantelas A, Philippidis H, Stylianopoulou F: **Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus.** *Brain Res* 2005, **1052**(2):187-195.

397. Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM: **Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats.** *Eur J Neurosci* 2007, **25**(10):3091-3098.
398. Pervanidou P, Chrousos GP: **Post-traumatic Stress Disorder in children and adolescents: from Sigmund Freud's "trauma" to psychopathology and the (Dys)metabolic syndrome.** *Horm Metab Res* 2007, **39**(6):413-419.
399. Valsamakis G, Kanaka-Gantenbein C, Malamitsi-Puchner A, Mastorakos G: **Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1092**:138-147.
400. Bamfo JE, Odibo AO: **Diagnosis and management of fetal growth restriction.** *J Pregnancy* 2011, **2011**:640715.
401. Smith GP: **Accumbens dopamine mediates the rewarding effect of orosensory stimulation by sucrose.** *Appetite* 2004, **43**(1):11-13.
402. Machado TD, Dalle Molle R, Laureano DP, Portella AK, Werlang IC, Benetti CaS, Noschang C, Silveira PP: **Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for "comfort foods" in adult female rats.** *Stress* 2013, **16**(5):549-556.
403. Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA *et al*: **Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism.** *Int J Dev Neurosci* 2010, **28**(1):111-118.
404. Vazquez V, Farley S, Giros B, Daugé V: **Maternal deprivation increases behavioural reactivity to stressful situations in adulthood: suppression by the CCK2 antagonist L365,260.** *Psychopharmacology (Berl)* 2005, **181**(4):706-713.

405. Mathieu G, Denis S, Laviaille M, Vancassel S: **Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008, **78**(6):391-401.
406. Vancassel S, Blondeau C, Lallemand S, Cador M, Linard A, Laviaille M, Dellu-Hagedorn F: **Hyperactivity in the rat is associated with spontaneous low level of n-3 polyunsaturated fatty acids in the frontal cortex.** *Behav Brain Res* 2007, **180**(2):119-126.
407. Vancassel S, Aid S, Pifferi F, Morice E, Nosten-Bertrand M, Chalon S, Laviaille M: **Cerebral asymmetry and behavioral lateralization in rats chronically lacking n-3 polyunsaturated fatty acids.** *Biol Psychiatry* 2005, **58**(10):805-811.
408. Raygada M, Cho E, Hilakivi-Clarke L: **High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offspring's aggressive behavior, immobility in the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity.** *J Nutr* 1998, **128**(12):2505-2511.
409. Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C: **The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior.** *Int J Dev Neurosci* 2005, **23**(1):93-99.
410. Zhu X, Peng S, Ma X, Li T: **[Effect of maternal deprivation on emotion and expression of dopamine transporter in adult rats].** *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010, **35**(1):32-37.
411. Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A: **Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and**

- behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats.** *Eur J Neurosci* 2004, **19**(7):1863-1874.
412. Diehl LA, Silveira PP, Leite MC, Crema LM, Portella AK, Billodre MN, Nunes E, Henriques TP, Fidelix-da-Silva LB, Heis MD *et al*: **Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats.** *Brain Res* 2007, **1144**:107-116.
413. Piazza PV, Rougé-Pont F, Deminière JM, Kharoubi M, Le Moal M, Simon H: **Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration.** *Brain Res* 1991, **567**(1):169-174.
414. Blondeau C, Dellu-Hagedorn F: **Dimensional analysis of ADHD subtypes in rats.** *Biol Psychiatry* 2007, **61**(12):1340-1350.
415. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST: **Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(4):1751-1756.
416. Schmitz G, Ecker J: **The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids.** *Prog Lipid Res* 2008, **47**(2):147-155.
417. Ladelfa MF, Toledo MF, Laisecca JE, Monte M: **Interaction of p53 with tumor suppressive and oncogenic signaling pathways to control cellular reactive oxygen species production.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **15**(6):1749-1761.
418. Cardoso HD, Passos PP, Lagranha CJ, Ferraz AC, Santos Júnior EF, Oliveira RS, Oliveira PE, Santos ReC, Santana DF, Borba JM *et al*: **Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult**

- induced by reduced dietary levels of essential fatty acids.** *Front Hum Neurosci* 2012, **6**:249.
419. Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF: **Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain.** *Front Mol Neurosci* 2014, **7**:24.
420. Park MK, Hoang TA, Belluzzi JD, Leslie FM: **Gender specific effect of neonatal handling on stress reactivity of adolescent rats.** *J Neuroendocrinol* 2003, **15**(3):289-295.
421. Ferreira CF, Bernardi JR, Krolow R, Arcego DM, Fries GR, de Aguiar BW, Senter G, Kapczinski FP, Silveira PP, Dalmaz C: **Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress in rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 2013, **107**:11-19.
422. Liu Y, Chen L, Xu X, Vicaut E, Sercombe R: **Both ischemic preconditioning and ghrelin administration protect hippocampus from ischemia/reperfusion and upregulate uncoupling protein-2.** *BMC Physiol* 2009, **9**:17.
423. Diano S, Matthews RT, Patrylo P, Yang L, Beal MF, Barnstable CJ, Horvath TL: **Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning.** *Endocrinology* 2003, **144**(11):5014-5021.
424. Tur JA, Bibiloni MM, Sureda A, Pons A: **Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits.** *Br J Nutr* 2012, **107 Suppl 2**:S23-52.
425. Salum GA, Isolan LR, Bosa VL, Tocchetto AG, Teche SP, Schuch I, Costa JR, Costa MeA, Jarros RB, Mansur MA *et al*: **The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings.** *Rev Bras Psiquiatr* 2011, **33**(2):181-195.

426. Birmaher B, Brent DA, Chiappetta L, Bridge J, Monga S, Baugher M: **Psychometric properties of the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED): a replication study.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999, **38**(10):1230-1236.
427. Birmaher B, Khetarpal S, Brent D, Cully M, Balach L, Kaufman J, Neer SM: **The Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED): scale construction and psychometric characteristics.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997, **36**(4):545-553.
428. Willett WC: **Nutritional Epidemiology:** Oxford: Oxford University Press; 1998.
429. Slater B, Philippi ST, Fisberg RM, Latorre MR: **Validation of a semi-quantitative adolescent food frequency questionnaire applied at a public school in São Paulo, Brazil.** *Eur J Clin Nutr* 2003, **57**(5):629-635.
430. Howe PR, Meyer BJ, Record S, Baghurst K: **Contribution of red meat to very long chain omega-3 fatty acid (VLCOmega3) intake.** *Asia Pac J Clin Nutr* 2003, **12**(Suppl):S27.
431. IBGE: **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, Análise de Consumo Alimentar no Brasil.** In.: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); 2011.
432. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G: **Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity.** *Biol Psychiatry* 2005, **57**(9):1068-1072.

433. Karege F, Schwald M, Cisse M: **Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets.** *Neurosci Lett* 2002, **328**(3):261-264.
434. Schmidt HD, Duman RS: **Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models.** *Neuropsychopharmacology* 2010, **35**(12):2378-2391.
435. Lang UE, Hellweg R, Seifert F, Schubert F, Gallinat J: **Correlation between serum brain-derived neurotrophic factor level and an in vivo marker of cortical integrity.** *Biol Psychiatry* 2007, **62**(5):530-535.
436. Frey BN, Andreazza AC, Houenou J, Jamain S, Goldstein BI, Frye MA, Leboyer M, Berk M, Malhi GS, Lopez-Jaramillo C *et al*: **Biomarkers in bipolar disorder: A positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force.** *Aust N Z J Psychiatry* 2013, **47**(4):321-332.

PARTE IV

1. ANEXOS

1.1. CARTAS DE APROVAÇÕES: COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 110217

Data da Versão do Projeto: 14/08/2012

Pesquisadores:

MARCELO ZUBARAN GOLDANI

PATRICIA PELUFO SILVEIRA

JULIANA ROMBALDI BERNARDI

CHARLES FRANCISCO FERREIRA

GABRIELLE SENTER

Título: Modulação da vulnerabilidade a um modelo nutricional de transtorno bipolar através de variações do ambiente perinatal efeitos da manipulação e separação materna neonatais sobre comportamentos sociais de ratos machos adultos.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 30 de agosto de 2012.

Dr. Alessandro Osvaldt
Coordenador CEUA/HCPA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 110216

Data da Versão do Projeto: 14/08/2012

Pesquisadores:

MARCELO ZUBARAN GOLDANI

PATRICIA PELUFO SILVEIRA

JULIANA ROMBALDI BERNARDI

CHARLES FRANCISCO FERREIRA

GABRIELLE SENTER

Título: Cuidado materno e composição do leite em ratas estressadas no período neonatal e submetidas a um modelo experimental de transtorno de humor bipolar.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 26 de setembro de 2012.

Dr. Alexandre Cevaldt
Coordenador CEUA/HCPA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110097

Data da Versão do Projeto: 16/05/2011

Data da Versão do TCLE: 10/06/2011

Pesquisadores:

CLECIO HOMRICH DA SILVA

PATRICIA PELUFO SILVEIRA

VERA LUCIA BOSA

RAFAELA DA SILVEIRA CORRÊA

CHARLES FRANCISCO FERREIRA

JULIANA ROMBALDI BERNARDI

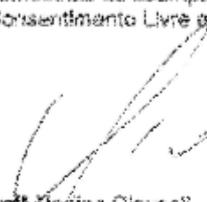
MARCELO ZUBARAN GOLDANI

Título: Projeto IVAPSA - Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Recém-Nascido nos Primeiros Seis Meses de Vida

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 27 de junho de 2011.


Prof. Nadine Clouse
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 100597

Versão do Projeto: 22/02/2011

Pesquisadores:

CARLA DA SILVA BENETTI

JULIANA ROMBALDI BERNARDI

CHARLES FRANCISCO FERREIRA

PATRICIA PELUFO SILVEIRA

Título: Estudo da interação entre a manipulação neonatal e a desnutrição na adolescência sobre a locomoção e o consumo de doce em ratos na vida adulta

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.



Dr. Alessandro Bersch Oswaldt
Coordenador da CEUA/HCPA

Porto Alegre, 12 de abril de 2011.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 09-410

Versão do Projeto: 19/10/2009

Pesquisadores:

PATRICIA PELUFO SILVEIRA

FERNANDA URRUTH FONTELLA

MARCELO ZUBARAN GOLDANI

ANDRE KRUMEL PORTELLA

FLAVIO KAPCZINSKI

KEILA MARIA MENDES CERESER

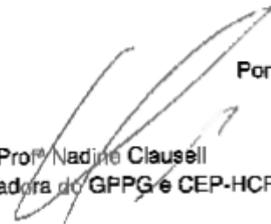
MARCIA KAUER SANT'ANNA

GABRIEL RODRIGO FRIES

Título: MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM ANIMAIS EXPOSTOS À
MANIPULAÇÃO OU SEPARAÇÃO NEONATAL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente a CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 21 de outubro de 2009.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

1.2. DEMAIS PUBLICAÇÕES AO LONGO DO DOUTORADO: 2010 -2015

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *PSYCHOLOGY AND NEUROSCIENCE*, JANEIRO DE 2015.

E-MAIL DE ACEITE:

06-Jan-2015

Dear Dr. Passos:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Alcohol use in adolescence, impulsivity and risk-taking behavior in Wistar rats" in its current form for publication in *Psychology & Neuroscience*.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of *Psychology & Neuroscience*, we look forward to your continued contributions to the Journal

Sincerely,

Dr. J. Landeira-Fernandez

Editor-in-Chief, *Psychology & Neuroscience*

landeira@puc-rio.br



Alcohol use in adolescence, impulsivity and risk-taking behavior in Wistar rats

Journal:	<i>Psychology & Neuroscience</i>
Manuscript ID:	PN-2014-0077.R3
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	05-Jan-2015
Complete List of Authors:	Passos, Jonatas; UFRGS - Psicologia, Psicologia do Desenvolvimento Pires, Augusto; UFRGS - Psicologia, Psicologia do Desenvolvimento Scheidt, Letícia; UFRGS - Psicologia, Psicologia do Desenvolvimento de Almeida, Luis; UFRGS - Psicologia, Psicologia do Desenvolvimento Ferreira, Charles; UFRGS - Biological Sciences, Neuroscience Gubert, Carolina; UFRGS - Biological Sciences, Biochemistry Bizarro, Lisiane; UFRGS, Psychology; UFRGS - Psicologia, Psicologia do Desenvolvimento de Almeida, Rosa; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ; UFRGS - Psicologia, Psicologia do Desenvolvimento
Keyword:	Impulsivity, risk-taking behavior, anxiety, delay discounting, alcohol abuse

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/pn-scielo>

Early Life Stress Interacts with the Diet Deficiency of Omega-3 Fatty Acids during the Life Course Increasing the Metabolic Vulnerability in Adult Rats

Juliana R. Bernardi¹, Charles F. Ferreira^{1,2}, Gabrielle Senter¹, Rachel Krolow³, Bianca W. de Aguiar⁴, André K. Portella¹, Márcia Kauer-Sant'Anna⁴, Flávio Kapczinski⁴, Carla Dalmaz^{2,3}, Marcelo Z. Goldani¹, Patrícia P. Silveira^{1,2*}

1 Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **4** Bipolar Disorders Program and INCT Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

Early stress can cause metabolic disorders in adulthood. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) deficiency has also been linked to the development of metabolic disorders. The aim of this study was to assess whether an early stressful event such as maternal separation interacts with the nutritional availability of n-3 PUFAs during the life course on metabolic aspects. Litters were randomized into: maternal separated (MS) and non-handled (NH). The MS group was removed from their dam for 3 hours per day and put in an incubator at 32°C on days 1° to 10° postnatal (PND). On PND 35, males were subdivided into diets that were adequate or deficient in n-3 PUFAs, and this intervention was applied during the subsequent 15 weeks. Animal's body weight and food consumption were measured weekly, and at the end of the treatment tissues were collected. MS was associated with increased food intake ($p = 0.047$) and weight gain ($p = 0.012$), but no differences were found in the NPY hypothalamic content between the groups. MS rats had also increased deposition of abdominal fat ($p < 0.001$) and plasma triglycerides ($p = 0.018$) when compared to the NH group. Interactions between early life stress and n-3 PUFAs deficiency were found in plasma insulin ($p = 0.033$), HOMA index ($p = 0.049$), leptin ($p = 0.010$) and liver PEPCK expression ($p = 0.050$), in which the metabolic vulnerability in the MS group was aggravated by the n-3 PUFAs deficient diet exposure. This was associated with specific alterations in the peripheral fatty acid profile. Variations in the neonatal environment interact with nutritional aspects during the life course, such as n-3 PUFAs diet content, and persistently alter the metabolic vulnerability in adulthood.

Citation: Bernardi JR, Ferreira CF, Senter G, Krolow R, de Aguiar BW, et al. (2013) Early Life Stress Interacts with the Diet Deficiency of Omega-3 Fatty Acids during the Life Course Increasing the Metabolic Vulnerability in Adult Rats. *PLoS ONE* 8(4): e62031. doi:10.1371/journal.pone.0062031

Editor: Wolf-Hagen Schunck, Max Delbrueck Center for Molecular Medicine, Germany

Received: October 8, 2012; **Accepted:** March 16, 2013; **Published:** April 17, 2013

Copyright: © 2013 Bernardi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Financial support is from ARD/FAPERGS 2010 (Silveira PP, 10/0474-2) and PRONEM/FAPERGS; Universal National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq)– Brazil 2010 (Silveira PP, 478820/2010-0); FIPE/HCPA (GPPG 09-410); Foundation for the Coordination of Higher Education and Graduate Training (CAPES) and INCT Translational Medicine (CNPq) 573671/2008-7. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: 00032386@ufrgs.br

Introduction

The maternal separation (MS) is a well-known paradigm can be used to examine the biological consequences of early-life stress [1] [2]. The acute physiological responses to separation are well established [3] [4]. However, this model has been associated with altered mother-pup interaction, which in turn could influence the pup's development and mediate the long-term changes seen in adult offspring [5]. Regarding the consequences, maternal separated adult rats exhibit high stress responsiveness, demonstrating higher levels of glucocorticoids after acute stress and alterations in emotional and behavioral regulation when challenged in specific experimental environments [5]. They are also more vulnerable to develop a behavioral profile comparable to depression [2] [6] [7] and anxiety-like behaviors in adulthood [2] [8]. Considering the effects associated with MS, this model has

been suggested to constitute an interesting model for early environmental stress and to propitiate the investigation of the long-term effects of neonatal interventions.

Stress or excess glucocorticoids exposure in sensitive phases of development such as the fetal or neonatal periods are important risk factors for the development of chronic illnesses such as obesity, type 2 diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease later in life [9] [10] [11]. This has been hypothesized as a key element in the early origins of these adult diseases [10] [12] and animal models have been used to specifically investigate the mechanisms of developmental programming [13]. In monkeys, stress applied during a critical period results in the emergence of obesity and insulin resistance in the peripubertal age [14]. In rats, fetal adverse environments can prenatally affect the expression of

STUDY PROTOCOL

Open Access

Impact of perinatal different intrauterine environments on child growth and development in the first six months of life - IVAPSA birth cohort: rationale, design, and methods

Juliana Rombaldi Bernardi, Charles Francisco Ferreira, Marina Nunes, Clécio Homrich da Silva, Vera Lúcia Bosa, Patrícia Pelufo Silveira and Marcelo Zubaran Goldani*

Abstract

Background: In the last twenty years, retrospective studies have shown that perinatal events may impact the individual health in the medium and long term. However, only a few prospective studies were designed to address this phenomenon. This study aims to describe the design and methods of the Impact of Perinatal Environmental Variations in the First Six Months of Life - the IVAPSA Birth Cohort.

Method/Design: This is a clinical study and involves the recruitment of a birth cohort from hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Mothers from different clinical backgrounds (hypertensive, diabetics, smokers, having an intrauterine growth restricted child for idiopathic reasons, and controls) will be invited to join the study twenty-four hours after the birth of their child. Data on economic, social, and maternal health care, feeding practices, anthropometric measures, physical activity, and neuropsychological evaluation will be obtained in interviews at postpartum, 7 and 15 days, 1, 3 and 6 months of life.

Discussion: To our knowledge, this is the first thematic cohort focused on the effects of intrauterine growth restriction to prospectively enroll mothers from different clinical backgrounds. The IVAPSA Birth Cohort is a promising research platform that can contribute to the knowledge on the relationship between perinatal events and their consequences on the children's early life.

Keywords: Infant, Low birth weight, Preterm birth, DOHaD, Programming, Barker hypothesis

Background

Over the past twenty years, several studies have shown that perinatal events may impact the individual's health in the medium and long term. The initial reports of Barker and colleagues, relating low birth weight with increased cardiovascular risk in adulthood, were followed by studies showing that, as a group, low birth weight subjects persisted biologically different from those of adequate weight until adulthood. They had higher blood pressure [1], being more likely to develop

type II diabetes [2] and metabolic syndrome as adults [3]. In addition, in subsequent reports, these and other researchers demonstrated that low birth weight was associated with an altered pattern of plasma lipids [4], reduced bone density [5] differentiated responses to stress [6], less elastic arteries [7], specific patterns of hormone secretion [8] and higher incidence of depression [9,10]. Moreover, it has been shown that different insults during the pregnancy and neonatal period bring long-term consequences to the offspring, even without affecting birth weight [11,12]. In this protocol, we aim to address these ideas, grouped into a new branch of scientific knowledge called "Developmental Origins of Health and Disease" (DOHaD).

* Correspondence: mgoldani@hcpa.ufrgs.br
Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903 - Porto Alegre/RS - Brazil

Review Article

Fetal and Neonatal Levels of Omega-3: Effects on Neurodevelopment, Nutrition, and Growth

**Juliana Rombaldi Bernardi, Renata de Souza Escobar,
Charles Francisco Ferreira, and Patrícia Pelufo Silveira**

*Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil*

Correspondence should be addressed to Patrícia Pelufo Silveira, 00032386@ufrgs.br

Received 8 August 2012; Accepted 19 September 2012

Academic Editors: C. Capurso, P. Pérez-Martínez, and Y. Vandenplas

Copyright © 2012 Juliana Rombaldi Bernardi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Nutrition in pregnancy, during lactation, childhood, and later stages has a fundamental influence on overall development. There is a growing research interest on the role of key dietary nutrients in fetal health. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFAs) play an important role in brain development and function. Evidence from animal models of dietary n-3 LCPUFAs deficiency suggests that these fatty acids promote early brain development and regulate behavioral and neurochemical aspects related to mood disorders (stress responses, depression, and aggression and growth, memory, and cognitive functions). Preclinical and clinical studies suggest the role of n-3 LCPUFAs on neurodevelopment and growth. n-3 LCPUFAs may be an effective adjunctive factor for neural development, growth, and cognitive development, but further large-scale, well-controlled trials and preclinical studies are needed to examine its clinical mechanisms and possible benefits. The present paper discusses the use of n-3 LCPUFAs during different developmental stages and the investigation of different sources of consumption. The paper summarizes the role of n-3 LCPUFAs levels during critical periods and their effects on the children's neurodevelopment, nutrition, and growth.

1. Introduction

Arachidonic acid (AA; 20:4n-6) and Docosahexaenoic acid (DHA; 22:5n-3) are essential for brain growth and cognitive development; they also accumulate rapidly in the brain and retina during the later stages of gestation and early postnatal life [1–3].

During pregnancy, AA and DHA are transported across the placenta into fetal venous blood [4, 5]. Nutrition in pregnancy has a significant influence on fetal development. In this sense, there is an increasing interest on the role of key dietary nutrients in subsequent health status or diseases [6]. The major effects of higher levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFAs) during pregnancy are associated with the development of brain and nerve tissues during the period of maximum intrauterine accretion [7].

After birth, breast milk is the source of AA and DHA to the neonate; the content of essential polyunsaturated

fatty acids (PUFAs) in breast milk is dependent on the maternal intake of these fatty acids [8, 9]. The content of essential PUFAs may be low in populations eating primarily plant-based diets with no or limited fish intake [10]. The consumption of PUFAs is essential for the development of the brain and nervous system of children and teenagers [11].

The contribution of DHA for better neurodevelopment has been documented in breastfed infants. However, the effects of different levels of DHA in human milk and maternal DHA supplementation limited to the lactation period are still under investigation [7]. In foods, the most important source of DHA is fish and fish oil [12]. Sea fish are generally a better source of DHA than freshwater fish [10]. Hence, in many studies the consumption of marine foods is evaluated separately.

Researchers and mothers have turned to fish oil supplements, which are generally low in contaminants (methylmercury) and can provide substantially higher doses of

REVISOR DE PERIÓDICOS

1. 2015 – Atual Psychoneuroendocrinology - ELSEVIER.
2. 2015 – Atual Lipids – SPRINGER.
3. 2013 – Atual Periódico: Revista Mirante – FACOS.

PRÊMIOS E TÍTULOS

1. Destaque V Mostra de Iniciação Científica, Faculdade Cenecista de Osório - CNEC FACOS Osório. 2014
2. Destaque IV Mostra de Iniciação Científica. Faculdade Cenecista de Osório - CNEC FACOS Osório. 2013

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. **FERREIRA, C.F.**; COUTO-PEREIRA, N.; BERNARDI, J.R.; SILVA, D.C.; ARCEGO, D.M.; LAMPERT, C.; TONIAZZO, A.P.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Disruptance of mother-pup interaction affects maternal behaviour independently of the separation period duration. In: Fifth Parental Brain Conference, 2013, Regensburg, Germany. Fifth Parental Brain Conference. Regensburg, Germany. Fifth Parental Brain Conference, 2013. p. 60.
2. GADIS, J.C.; LUZ, S.F.; PEREIRA, G.W.; **FERREIRA, C.F.** A decadência de Cristiane F. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 34-35.

3. SILVA, A.S.B.; GERSON, G.; CHRISTMANN, M.R.; **FERREIRA, C.F.** Alex, um predador social: transtorno de personalidade ou efeito do meio? In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 66-67.
4. QUINTANILHA, L.A.; **FERREIRA, C.F.** Aprendendo como se aprende. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 75-76.
5. VALDUGA, K.; OLIVEIRA, M.D.; GHELLERE, M.A.N.; SOARES, M.B.C.S.; **FERREIRA, C.F.** Compreendendo Dory. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 95-96.
6. SANTOS, C.C.; HULLER, K.; QUINTANILHA, L.A.; FERRI, S.D.; **FERREIRA, C.F.** Conhecendo os transtornos somatoformes. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 97-98.
7. SANTOS, B.; CARDOSO, H.L.; LEITE, M.; **FERREIRA, C. F.** Meninos(as) não choram? In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 184-185.

8. RODRIGUES, C.B.; **FERREIRA, C.F.** Percepção de estresse pelos alunos de Psicologia da FACOS. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 222-223.
9. OLIVEIRA, C.; PAULA, L.F.; FIALHO, M.C.V.; GOLDANI, S.; **FERREIRA, C. F.** Priscilla, a rainha do deserto e o transtorno de identidade de gênero. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 240-241.
10. TOMASHESKI, A.P.K.; FURTADO, L.S.; ANDRADE, P.P.; CASTRO, R.B.; **FERREIRA, C.F.** Rebelia típica da adolescência ou início de um transtorno? In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 264-265.
11. DECARLI, B.C.; BAUER, G.; PEREIRA, M.E.; CHAVES, S.C.; **FERREIRA, C.F.** Te conheço? Dificuldades de se viver com amnésia anterógrada. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 292-293.
12. STENZEL, F.; SILVA, F.J.B.; SANTOS, L.A.; **FERREIRA, C.F.** Tratamento 'Pequena Miss Sunshine': integração, família e transtornos de humor. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS.

- Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 302-303.
- 13. MILANEZI, C.S.; RODRIGUES, C.B.; GUAZZELLI, C.M.B.; NUNES, E.T.; FERREIRA, C.F.** Um desejo de maldade. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 304-305.
- 14. LOTTI, F.D.; GERHARDT, F.P.; CALABRESI, D.A.B.; FERREIRA, C.F.** Uma mente sem lembranças. In: IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório, 2013, Osório, RS. Anais da IV Mostra Integrada de Iniciação Científica - CNEC Osório. Osório, RS.: Faculdade Cenecista de Osório - CNEC Osório, 2013. v. 4. p. 308-309.
- 15. SENTER, G.; BERNARDI, J.R.; FERREIRA, C.F.; HUFFELL, A.P.S.; KROLOW, R.; PORTELLA, A.K.; KAPCZINSKI, F.; ARCEGO, D.M.; DALMAZ, C.; SILVEIRA, P.P.** Estresse neonatal interage com a dieta deficiente em ácidos graxos poliinsaturados (n-3) ao longo da vida aumentando a vulnerabilidade metabólica em ratos machos adultos.. In: 32a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2012, Porto Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 32a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012. v. 32. p. 195-195.
- 16. BERNARDI, J.R.; FERREIRA, C.F.; NUNES, M.; REIS, A.R.; MUCCELLINI, A.B.; GONCALVES, E.N.; WERLANG, I.C.R.; ALVES, M.B.; BRITO, M.L.;**

ROCHA, P.B.; CORREA, R.S.; ESCOBAR, R.S.; REIS, R.S.; SILVA, C.H.; BOSA, V.L.; SILVEIRA, P.P.; GOLDANI, M.Z. Impacto das variações do ambiente perinatal sobre a saúde do recém-nascido nos primeiros seis meses de vida - Projeto IVAPSA, dados preliminares. In: 32a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2012, Porto Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 32a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012. v. 32. p. 196-196.

17. BERNARDI, J.R.; FERREIRA, C.F.; SENTER, G.; ALVES, M.B.; BORTOLIN, R.C.; BENETTI, C.; DALMAZ, C.; SILVEIRA, P.P. Interação entre a manipulação neonatal e a desnutrição na adolescência no peso corporal e no consumo de doce em ratos machos adultos. In: 32a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2012, Porto Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 32a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012. v. 32. p. 196-196.

18. ARCEGO, D.M.; FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; HUFFELL, A.P.S.; KROLOW, R.; SENTER, G.; PORTELLA, A.K.; GOLDANI, M.Z.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Investigação de interações entre estresse neonatal e deficiência dietética de ômega-3 ácidos graxos poli-insaturados (n-3 PUFAs) ao longo da vida sobre parâmetros de estresse oxidativo cardíaco de ratos adultos.. In: 32a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2012, Porto Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e

Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 32a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012. v. 32. p. 260-260.

19. FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; SENTER, G.; KROLOW, R.; ARCEGO, D.M.; FRIES, G.R.; AGUIAR, B.W.; PANIZZUTTI, B.S.; PORTELLA, A.K.; GOLDANI, M.Z.; KAPCZINSKI, F.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Investigação de interações entre estresse neonatal e deficiência dietética de n-3 ácidos graxos poli-insaturados (n-3 PUFAs) ao longo da vida sobre níveis de BDNF hipocampal em ratos adultos.. In: 32a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2012, Porto Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 32a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012. v. 32. p. 295-295.

20. FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; FRIES, G.R.; SENTER, G.; KROLOW, R.; PORTELLA, A.K.; KAPCZINSKI, F.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Vulnerability to a nutritional deficiency of n-3 polyunsaturated fatty acids (N-3 PUFAs) by exposure to early stress - Effects on behavior and neurochemistry.. In: Excitotoxicity and Neuroprotection Spring School, 2011, Porto Alegre, RS. Abstract Book, 2011. p. 36-36.

21. LINARTEVICH, V.F.; TORREJAIS, M.M.; PADOVANI, C.R.; SOARES, A.; FERREIRA, C.F.; SENTER, G.; BERNARDI, J.R. Alterações de peso, proteínas séricas e fibras musculares de ratos submetidos à desnutrição proteica. In: 30a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2010, Porto

Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 30a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2010. v. 30. p. 129-129.

22. FERREIRA, C.F.; DE CONTO, E.; SOUZA, M.A.; LUTZ, M.L.; JACOBS, S.; BERNARDI, J.R.; SENTER, G.; FERREIRA, A.; LUCION, A.B. Efeitos do estresse perinatal sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona e prolactina de ratas. In: 30a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2010, Porto Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 30a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2010. v. 30. p. 135-135.

APRESENTAÇÕES DE TRABALHO

- 1. FERREIRA, C.F.** Tecnologias e Espaços de Aprendizagem. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 2. FERREIRA, C.F.** Contribuição das Neurociências para o aprendizado e para a memória. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 3. FERREIRA, C.F.** Neurociências e Inclusão. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 4. SILVA, D.C.; FERREIRA, C.F.; COUTO-PEREIRA, N.; BERNARDI, J.R.; ARCEGO, D.M.; LAMPERT, C.; TONIAZZO, A.P.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C.** Efeitos de diferentes tempos de separação mãe-filhotes no

- período neonatal sobre o comportamento materno em ratos.. 2013.
(Apresentação de Trabalho/Outra).
5. **FERREIRA, C.F.** Desenvolvimento Humano: aspectos sobre a saúde e a doença. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 6. **LOTTI, F.D.; GERHARDT, F.P.; CALABRESI, D.A.B.; FERREIRA, C.F.** Uma mente sem lembranças. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 7. **VALDUGA, K.; SOARES, M.B.C.S.; OLIVEIRA, M.D.; GHELLERE, M.A.N.; FERREIRA, C.F.** Compreendendo Dory. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 8. **GOLDANI, S.; PAULA, L.F.; FIALHO, M.C.V.; OLIVEIRA, C.; FERREIRA, C.F.** Priscilla - A rainha do deserto e o transtorno de identidade de gênero. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 9. **SANTOS, L.A.; SILVA, F.J.B.; STENZEL, F.; FERREIRA, C.F.** Tratamento 'Pequena Miss Sunshine': integração família e transtorno de humor. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 10. **NUNES, E.T.; RODRIGUES, C.B.; MILANEZI, C.S.; GUAZZELLI, C.M.B.; FERREIRA, C.F.** Um desejo de maldade. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 11. **CHRISTMANN, M.R.; SILVA, A.S.B.; GERSON, G.; FERREIRA, C.F.** A-lex, um predador social: transtorno de personalidade ou efeito do meio? 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 12. **ANDRADE, P.P.; TOMASHESKI, A.P.K.; FURTADO, L.S.; CASTRO, R.B.; FERREIRA, C.F.** Rebeldia típica da adolescência ou início de um transtorno? 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

13. GADIS, J.C.; LUZ, S. F.; FREITAS, B.N.; SCHIAVO, G.L.; PEREIRA, G.W.; **FERREIRA, C.F.** A decadência de Christiane F. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
14. CHAVES, S.C.; PEREIRA, M.E.; DECARLI, B.C.; BAUER, G.; **FERREIRA, C.F.** Te conheço? Dificuldades de se viver com amnésia anterógrada. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
15. CARDOSO, H.L.; SANTOS, B.; LEITE, M.; **FERREIRA, C.F.** Meninos(as) não choram? 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
16. QUINTANILHA, L.A.; **FERREIRA, C.F.** Aprendendo como se aprende. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
17. RODRIGUES, C.B.; **FERREIRA, C.F.** Percepção de estresse pelos alunos de Psicologia da FACOS. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
18. SANTOS, C.C.; FERRI, S.D.; QUINTANILHA, L.A.; HULLER, K.; **FERREIRA, C.F.** Conhecendo os transtornos somatoformes. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
19. ARCEGO, D.M.; **FERREIRA, C.F.**; BERNARDI, J.R.; HUFFELL, A.P.S.; KROLOW, R.; SENTER, G.; PORTELLA, A.K.; GOLDANI, M.Z.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Investigação de interações entre estresse neonatal e deficiência dietética de ômega-3 ácidos graxos poliinsaturados (n-3 PUFAs) ao longo da vida sobre parâmetros de estresse oxidativo cardíaco de ratos adultos.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
20. **FERREIRA, C.F.**; BERNARDI, J.R.; SENTER, G.; KROLOW, R.; ARCEGO, D.M.; FRIES, G.R.; AGUIAR, B.W.; PANIZZUTTI, B.S.; PORTELLA, A.K.; GOLDANI, M.Z.; KAPCZINSKI, F.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Investigação de interações entre estresse neonatal e deficiência dietética de N-3

- ácidos graxos poli-insaturados (N-3 PUFAs) ao longo da vida sobre níveis de BDNF hipocampal em ratos adultos.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 21.** SENTER, G.; BERNARDI, J.R.; **FERREIRA, C.F.**; HUFFELL, A.P.S.; KROLOW, R.; PORTELLA, A.K.; KAPCZINSKI, F.; DALMAZ, C.; SILVEIRA, P.P. Estresse neonatal interage com a dieta deficiente em ácidos graxos poliinsaturados (N-3 PUFAs) ao longo da vida aumentando a vulnerabilidade metabólica em ratos machos adultos.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 22.** BERNARDI, J.R.; **FERREIRA, C.F.**; NUNES, M.; REIS, A.R.; MUCCELLINI, A.B.; GONCALVES, E.N.; WERLANG, I.C.R.; ALVES, M.B.; BRITO, M.L.; ROCHA, P.B.; CORREA, R.S.; ESCOBAR, R.; REIS, R.S.; SILVA, C.H.; BOSA, V.L.; SILVEIRA, P.P.; GOLDANI, M.Z.. Impacto das variações do ambiente perinatal sobre a saúde do recém-nascido nos seis primeiros de vida. Projeto IVAPSA, dados preliminares. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 23.** BERNARDI, J.R.; **FERREIRA, C.F.**; SENTER, G.; ALVES, M.B.; BORTOLIN, R.C.; BENETTI, C.; DALMAZ, C.; SILVEIRA, P.P. Interação entre a manipulação neonatal e a desnutrição na adolescência no peso corporal e no consumo de doce em ratos machos adultos. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 24.** **FERREIRA, C.F.**; BERNARDI, J.R. Programação Metabólica. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 25.** **FERREIRA, C.F.**; BERNARDI, J.R.; KROLOW, R.; ARCEGO, D.M.; SENTER, G.; HUFFELL, A.P.S. ; PORTELLA, A.K.; KAPCZINSKI,

- F.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Estudo de vulnerabilidade a um modelo de transtorno bipolar induzido por dieta deficiente em ácidos graxos poliinsaturados. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 26. FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; KROLOW, R.; ARCEGO, D.M.; SENTER, G.; HUFFELL, A.P.S.; PORTELLA, A.K.; KAPCZINSKI, F.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C.** Vulnerability to a nutritional deficiency of N-3 polyunsaturated fatty acids (N-3 PUFAs) by exposure to early stress - Effects on behavior and metabolism.. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 27. SOUZA, D.L.; FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; NUNES, M.; GOLDANI, M.Z.** Informativo sobre células tronco focalizando a ética. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- 28. FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; FRIES, G.R.; SENTER, G.; KROLOW, R.; PORTELLA, A.K.; KAPCZINSKI, F.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C.** Vulnerability to a nutritional deficiency of n-3 polyunsaturated fatty acids (N-3 PUFAs) by exposure to early stress - Effects on behavior and neurochemistry. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 29. BERNARDI, J.R.; FERREIRA, C.F.; SENTER, G.; PORTELLA, A.K.; KAUER-SANTANNA, M.; GOLDANI, M.Z.; DALMAZ, C.; KAPCZINSKI, F.; SILVEIRA, P.P.** Vulnerability to a nutritional model of bipolar disorder through variations in the early environment - effects of neonatal handling and maternal separation. 2010. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 30. COSTA, K.C.; RAUBER, R.; LINARTEVICH, V.F.; FERREIRA, C.F.** Neuropeptídeo Vasopressina. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

- 31. RAUBER, R.; COSTA, K.C.; LINARTEVICH, V.F.; OLIVETTI, K.; PEREIRA, M.T.; FERREIRA, C.F.; FARINA, L.O.** Análise Físico-Química de Leite em Pó Modificado. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 32. FERREIRA, C.F.; DE CONTO, E.; SOUZA, M.A.; LUTZ, M.L.; JACOBS, S.; BERNARDI, J.R.; SENTER, G.; FERREIRA, A.; LUCION, A.B.** Efeitos do estresse perinatal sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona e prolactina de ratas. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 33. FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; SENTER, G.; PORTELLA, A.K.; KAUER-SANTANNA, M.; GOLDANI, M.Z.; DALMAZ, C.; SILVEIRA, P.P.; KAPCZINSKI, F.** Modulação da vulnerabilidade a um modelo nutricional de transtorno bipolar através de variações do ambiente perinatal - efeitos da manipulação e separação materna neonatais. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 34. LINARTEVICH, V.F.; TORREJAIS, M.M.; PADOVANI, C.R.; SOARES, A.; FERREIRA, C.F.; SENTER, G.; BERNARDI, J.R.** Alterações de peso, proteínas séricas e fibras musculares de ratos submetidos à desnutrição protéica. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 35. FERREIRA, C.F.; BERNARDI, J.R.; SENTER, G.; PORTELLA, A.K.; KAUER-SANTANNA, M.; GOLDANI, M.Z.; DALMAZ, C.; SILVEIRA, P.P.; KAPCZINSKI, F.** Modulação da vulnerabilidade a um modelo nutricional de transtorno bipolar através de variações do ambiente perinatal - efeitos da manipulação e separação materna neonatais.. In: 30a. Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre. 2010, Porto Alegre. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 30a Semana Científica do Hospital de Clínicas. Anais. Porto

Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2010. v. 30. p. 136-136.

OUTROS TIPOS DE PRODUÇÃO

1. **FERREIRA, C.F.** Contribuições das Neurociências para o aprendizado e para a memória. 2014. (Curso de curta duração ministrado/Outra).
2. **FERREIRA, C.F.** Bases Biológicas do Desenvolvimento Humano: aspectos sobre a saúde e a doença. 2014. .
3. **FERREIRA, C.F.** Nivelamento de Química. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
4. **FERREIRA, C.F.** Experimentação Animal: Princípios e Práticas. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
5. **FERREIRA, C.F.** Neurobiologia do cuidado parental. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
6. **FERREIRA, C.F.;** **SOUZA, M.A.** Vulnerabilidade perinatal e indicações clínicas: psicopatologias. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
7. **FERREIRA, C.F.** Neurobiologia do cuidado parental. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
8. **FERREIRA, C.F.** Depressão. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
9. **FERREIRA, C.F.** Neurobiologia do Vínculo Materno-Filial. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

BANCAS

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. RIBEIRO, A.M.; SOUZA, I.V; **FERREIRA, C.F.** Participação em banca de Natiele Cardoso Foss. Inventário faunístico do ecossistema de dunas do município de Tramandaí - Rio Grande do Sul. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas: Licenciatura) - Faculdade Cenecista de Osório.
2. GERMANI, J.C.; **FERREIRA, C.F.** Participação em banca de Emily De Conto. Polimorfismos do DNA: o que são e como detectá-los. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
3. TORREJAIS, M.M.; SOARES, A.; **FERREIRA, C.F.** Participação em banca de Wagner Fagnani Linartevichi. Estudo morfológico do músculo sóleo de ratos submetidos à desnutrição protéica. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

OUTRAS PARTICIPAÇÕES

1. **FERREIRA, C.F.** Avaliador de Pôsteres dos Trabalhos de Temas Livres da 31ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2011. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
2. **FERREIRA, C.F.** Avaliador de Pôsteres dos Trabalhos de Temas Livres da 30ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2010. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

1. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). VULNERABILITY TO A NUTRITIONAL DEFICIENCY IN N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (N-3 PUFAS) BY EXPOSURE TO EARLY STRESS EFFECTS ON BEHAVIOR AND METABOLISM. 2011. (Congresso).
2. Excitotoxicity and Neuroprotection Spring School - ENSS. Vulnerability to a nutritional deficiency of n-3 polyunsaturated fatty acids (N-3 PUFAs) by exposure to early stress - Effects on behavior and neurochemistry. 2011. (Simpósio).
3. II Curso de Neuropsicobiologia do Desenvolvimento. 2011. (Simpósio).

ORGANIZAÇÕES DE EVENTOS

1. **FERREIRA, C.F.** III Curso de Neurociências - UFRGS. 2011. (Outro).
2. **FERREIRA, C.F.**; DALLOGLIO, A.; REIS, A.R.; LAZZARETTI, C.; PIAZZA, F.V.; ÁLVARES, L.O.; CUNHA, N.B.; FRANCESCHI, R.C.; ZANCAN, D. II Curso de Verão em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010. (Outro).

ORIENTAÇÕES CONCLUÍDAS:

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

1. Diego Carrilho da Silva. Intervenções perinatais e o comportamento materno. 2013. Iniciação Científica. (Graduando em Enfermagem) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico. Orientador: Dra Carla Dalmaz. Acadêmicos de Pós-Graduação: Charles Francisco Ferreira, Natividade Couto-Pereira.

2. Gabrielle Senter. Modulação da vulnerabilidade a um modelo nutricional de transtorno bipolar através de variações do ambiente perinatal efeitos da manipulação e separação materna neonatais. 2010. Iniciação Científica. (Graduando em Medicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Dra Patrícia Pelufo Silveira. Acadêmicos de Pós-Graduação: Charles Francisco Ferreira, Juliana Rombaldi Bernardi.

DEMAIS INFORMAÇÕES

Pesquisador Júnior, Edital MCT/CNPq No 014/2010 Universal, Interação entre a exposição a um trauma no início da vida e a deficiência de n-3 PUFA sobre marcadores biológicos do transtorno bipolar um estudo translacional. Referência: Processo n 478820/2010-0 - Auxílio a Pesquisa. Proponente: Dra. Patrícia Pelufo Silveira.