

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

KAROLINE DOS SANTOS RODRIGUES

**DESMAME PRECOCE: IMPACTO MOLECULAR  
E COMPORTAMENTAL NA PROLE DE RATOS WISTAR**

PORTO ALEGRE

2020

**DESMAME PRECOCE: IMPACTO MOLECULAR  
E COMPORTAMENTAL NA PROLE DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Karoline dos Santos Rodrigues

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cristiane Matté

PORTO ALEGRE

2020

### CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos Rodrigues, Karoline  
DESMAME PRECOCE: IMPACTO MOLECULAR E  
COMPORTAMENTAL NA PROLE DE RATOS WISTAR / Karoline dos  
Santos Rodrigues. -- 2020.  
123 f.  
Orientadora: Cristiane Matté.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. DOHaD. 2. Desmame Precoce. 3. Programação  
Metabólica. 4. Estado Redox. 5. Comportamento Animal.  
I. Matté, Cristiane, orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço à minha mãe que, por muito tempo, se dedicou à dois empregos para me proporcionar todo suporte necessário para eu concluir meus estudos, que com todo excesso de trabalho nunca me deixou faltar amor e carinho. Agradeço ao meu pai, que mesmo longe sempre foi muito presente em minha vida. À minha avó Nena, dinda Regina e dindo Luizmar, por sempre me apoiarem a prosseguir na minha jornada profissional. Sabiam que vocês são as razões das minhas conquistas.

Agradeço à minha Dinda Fabiana, minha mentora, que desde antes da graduação sempre orientou com êxito a minha vida profissional e pessoal. Através de muito amor e puxões de orelha, contribuiu imensamente nas minhas decisões.

Agradeço à minha orientadora, Cristiane, que abriu as portas do seu laboratório e me ofereceu a oportunidade de realizar o mestrado. Sempre foi uma inspiração de pesquisadora, qual contribuiu de forma significativa ao meu crescimento profissional.

À Juliana Bender e Caroline Klein, que desde a minha graduação, me instruíram e me proporcionaram grandes aprendizados no laboratório 23.

Aos meus colegas do laboratório que sem o apoio deles seria impossível produzir este trabalho. Obrigada pela parceria e paciência comigo, tanto dentro quanto fora do ambiente de trabalho. Agradeço especialmente à Pauline, Bernardo e Régis, que sempre tiveram um tempinho para me acalmar nos momentos de ansiedade e angústia.

Ao Alexandre, obrigado por todo companheirismo durante todos esses anos de convivência.

Agradeço imensamente aos funcionários do Departamento de Bioquímica, que com grande competência me auxiliaram desde a parte prática até a parte administrativa.

Por fim, às agências de fomento CAPES, CNPq, PROPESQ e FAPERGS, pois sem o apoio financeiro a pesquisa se torna inviável.

*“The only thing that separates women of color from anyone else is opportunity”*

Viola Davis

Primetime Emmy Awards 2015

## Resumo

Os primeiros 1000 dias de vida são uma janela crítica de vulnerabilidade, onde a exposição a fatores ambientais pode influenciar positiva ou negativamente a saúde ao longo da vida. A ingestão exclusiva de leite materno, combinado com o cuidado materno, durante os primeiros seis meses de vida garante um melhor desenvolvimento ao recém-nascido. No entanto, o desmame precoce é uma prática que vem aumentando, a qual tem sido associada ao desenvolvimento de diversas alterações moleculares e comportamentais. Dessa forma, investigamos o efeito do desmame precoce aos 16 dias de vida sobre a homeostase redox e a função mitocondrial no cérebro de filhotes fêmeas e machos de ratos Wistar, além disso investigamos parâmetros comportamentais aos 60 dias de vida. Os filhotes foram divididos em 4 grupos: (1) desmame controle (desmame aos 21 dias pós-natal), (2) desmame precoce por bromocriptina (desmame aos 16 dias pós-natal), (3) desmame precoce por separação materna combinado com adoção (desmame aos 16 dias pós-natal), (4) desmame precoce por separação materna sem cuidados (desmame aos 16 dias pós-natal). Acompanhamos o peso corporal dos animais desde os 16 até os 59 dias de idade. No 21º dia, parte dos filhotes foram eutanasiados e o hipocampo e o hipotálamo foram removidos para avaliações bioquímicas. Medimos por citometria de fluxo a massa e o potencial de membrana mitocondrial, os níveis de superóxido mitocondrial, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, óxido nítrico e peroxidação lipídica. Avaliamos também as atividades de algumas enzimas antioxidantes. Os filhotes remanescentes foram submetidos aos testes comportamentais no 60º dia pós-natal. Realizamos os testes de campo aberto a fim de avaliar atividade motora, reconhecimento de objeto novo para avaliar a memória de longa duração de reconhecimento, teste de labirinto em Y para avaliar a memória de trabalho e a disposição dos roedores para explorar novos ambientes e labirinto em cruz elevado para avaliar o comportamento tipo ansioso na prole. Aos 16 dias de vida o desmame precoce por separação materna foi capaz de reduzir o peso corporal dos filhotes; em relação às alterações bioquímicas no hipocampo, o desmame alterou os níveis de óxido nítrico nas fêmeas do grupo desmame precoce por bromocriptina e por separação materna seguido por adoção, além disso a razão das atividades enzimáticas de SOD/GPx+CAT nas fêmeas em ambos os grupos de desmame precoce por separação materna apresentaram um aumento na razão enzimática; e no hipotálamo o desmame aumentou a peroxidação lipídica nos machos de ambos os grupos desmame precoce por separação materna. Aos 60 dias de vida, os filhotes machos apresentaram um peso corporal menor comparado com filhotes controles. Além disso, o peso corporal das fêmeas foi menor que os filhotes machos. Os filhotes machos do grupo desmame precoce por bromocriptina apresentaram um déficit de memória de longa duração, além de apresentarem um comportamento tipo ansioso, o grupo desmame precoce por separação materna seguido por adoção também apresentou um comportamento tipo ansioso. Dessa forma, concluímos que o desmame precoce pode ser prejudicial ao desenvolvimento do sistema nervoso central em relação à homeostase redox e pode promover alterações comportamentais e de aprendizado na vida adulta.

**Palavras-chave:** Desmame precoce; Programação metabólica; Estado Redox.

## **Abstract**

The first 1000 days of life are a critical window of vulnerability, where exposure to environmental factors can positively or negatively influence health throughout life. Exclusive intake of breast milk, combined with maternal care, during the first 6 months of life guarantees a better development of the newborn. However, early weaning is an increasing practice, which has been associated with the development of several molecular and behavioral changes. Thus, we investigated the effect of early weaning at 16 days of life on redox homeostasis and mitochondrial function in the brain of female and male pups of Wistar rats, in addition to investigating behavioral parameters at 60 days of life. The pups were divided into 4 groups: (1) control weaning (weaning at 21 postnatal days), (2) early weaning by bromocriptine (weaning at 16 postnatal days), (3) early weaning by maternal separation combined with adoption (weaning at 16 postnatal days), and (4) early weaning by separation without maternal care (weaning at 16 postnatal days). We monitor the animals' body weight from 16 to 59 days of age. On the 21st day, part of the pups was euthanized and the hippocampus and hypothalamus were removed for biochemical evaluations. We measured mitochondrial membrane potential and mass, levels of mitochondrial superoxide, reactive oxygen and nitrogen species, nitric oxide and lipid peroxidation by flow cytometry. We also evaluated the enzymatic activities of some antioxidant enzymes. The remaining pups were subjected to behavioral tests on the 60th postnatal day, we performed the open field test, recognition of new object, Y-Maze test and elevated plus-maze test. At 16 days of age, early weaning by maternal separation was able to reduce the pups' body weight; in relation to the biochemical changes in the hippocampus, weaning changed the levels of nitric oxide in females in the early weaning by bromocriptine and maternal separation followed by adoption groups. In addition, the SOD/GPx+CAT ratio in the females from both groups of the weaning early maternal separation showed an increase. In the hypothalamus, weaning increased lipid peroxidation in males in both groups of the early weaning by maternal separation. At 60 days of age, male pups had lower body weight compared to control pups, moreover the female body weight was lower than male. Male pups in the early bromocriptine weaning group had a long-term memory deficit evaluated by novel object recognition test, in addition to having an anxious type behavior. The early weaning by maternal separation followed by adoption group also showed an anxious type behavior. Thus, we conclude that early weaning can be detrimental to the development of the central nervous system in relation to redox homeostasis and can promote behavioral and learning changes in adulthood.

**Keywords:** DOHaD; Early weaning; Metabolic programming; Redox status.

## **Lista de abreviaturas**

5-HT- Receptores de serotonina

ACTH - *Adrenocorticotropic hormone*

AGE - *Advanced glycation end-products*

ATP - Adenosina trifosfato

ADP - Adenosina difosfato

AVP - Arginina vasopressina

BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor*

CAT - Catalase

DCFH - Diclorofluoresceína

DNA - Ácido desoxirribonucleico

eNOS - Óxido-nítrico-sintase endotelial

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

GC - Glicocorticoides

GLO1 - Glioxalase 1

GPx - Glutaciona-peroxidase

GR - Glutaciona-redutase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona oxidada

HLC - Hormônio liberador de corticotropina

HPA - Hipotálamo-hipófise-adrenal

iNOS - Óxido-nítrico-sintase induzível

MG - Metilglioxal

nNOS - Óxido-nítrico-sintase neuronal



NOS- Óxido-nítrico-sintase

OMS - Organização Mundial da Saúde

PGC-1 $\alpha$  - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*

PN - Pós-natal

SNC - Sistema nervoso central

STEM - Sistema de transporte de elétrons mitocondrial

SOD - Superóxido-dismutase

Trx - Tiorredoxina

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

## Sumário

1.	Introdução .....	1
1.1.	Aleitamento e sua importância para o organismo dos mamíferos.....	1
1.2.	Desmame precoce e suas consequências para a saúde: uma perspectiva de acordo com o conceito DOHaD.....	4
1.3.	Memória e sua relação com estresse na primeira infância .....	6
1.4.	Homeostase Redox e desmame precoce .....	8
1.5.	Justificativa.....	16
2.	Objetivos.....	17
2.1.	Objetivo Geral .....	17
2.2.	Objetivos Específicos .....	17
3.	Resultados.....	18
3.1.	Capítulo I.....	18
4.	Discussão .....	69
5.	Conclusão .....	83
	Referências .....	84
	Anexos.....	105
	Anexo I – Carta de Aprovação da CEUA.....	105
	Anexo II – Normas de Publicação do Periódico Científico The International Journal of Developmental Neuroscience .....	106

## **1. Introdução**

O desenvolvimento de um indivíduo nos seus primeiros 1000 dias é determinante para o estado de saúde e/ou a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças ao longo da vida, na infância, adolescência e vida adulta (BALE *et al.*, 2010). Após o nascimento, a alimentação do neonato através do aleitamento materno é essencial para o desenvolvimento pós-natal (AGOSTI *et al.*, 2017). Os compostos nutritivos provenientes da dieta, desde o período pré-natal até os primeiros anos de vida, podem modular processos adaptativos do metabolismo e causar modificações fisiológicas no organismo (KOLETZKO, 2005). Durante os dois primeiros anos de vida, a nutrição fornecida pela amamentação é essencial para a programação e para o desenvolvimento endócrino, neural, metabólico, imunológico, psicológico, e das funções sensoriais, executivas e comportamentais (AGOSTI *et al.*, 2017; ESTEBAN-CORNEJO *et al.*, 2017; GARTNER *et al.*, 2005; KOLETZKO, 2005). Além disso, a amamentação protege a criança contra o desenvolvimento de doenças infecciosas e crônicas (WHO, 2015). Diante desses benefícios a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que a alimentação do lactente seja exclusivamente com o leite materno durante os primeiros seis meses de vida, não incluindo até mesmo água (WHO, 2015). A partir dos seis meses, a demanda energética da criança aumenta, e a introdução de alimento sólido se torna complementar ao leite materno (WHO, 2015). Estudos clínicos e meta-análises demonstram que o tempo de aleitamento materno é positivamente correlacionado com a capacidade cognitiva de crianças e adolescentes (ANDERSON *et al.*, 1999; ESTEBAN-CORNEJO *et al.*, 2017; HORTA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2014), bem como está relacionado com menores índices de desenvolvimento de obesidade (BETOKO *et al.*, 2017; VICTORA *et al.*, 2016).

### **1.1. Aleitamento e sua importância para o organismo dos mamíferos**

O leite materno é um biofluido complexo e altamente rico em nutrientes que protege as crianças contra doenças durante a primeira infância. Assim, o leite materno é considerado a

alimentação padrão-ouro aos lactentes durante os primeiros meses de vida. O leite materno contém nutrientes como: ácidos graxos essenciais, ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, lactose, fosfolipídios, enzimas que aumentam a digestão, proteína do soro do leite ( $\alpha$ -lactoglobulina e lactoferrina), entre outros (BALLARD; MORROW, 2013; MATHUR; DHINGRA, 2014; PEREIRA *et al.*, 2010). Além dos nutrientes, o leite materno contém inúmeras moléculas bioativas que contribuem para a maturação do sistema imunológico, desenvolvimento e composição da microbiota (BALLARD *et al.*, 2013). A composição nutricional do leite materno é responsável pelos efeitos positivos através da alimentação exclusiva, o qual fornece perfeita nutrição, permitindo um crescimento saudável e um adequado desenvolvimento cerebral (ESTEBAN-CORNEJO *et al.*, 2017). Além da melhora à saúde, dados demonstram uma melhora econômica e diminuição ao prejuízo ambiental quando as crianças são amamentadas até os seis meses ou mais (ROLLINS *et al.*, 2016). Visto os benefícios que o aleitamento materno oferece ao lactente a OMS juntamente com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) recomendam que o aleitamento materno seja a alimentação exclusiva por seis meses, e posteriormente, os bebês sejam apresentados à alimentação complementar juntamente com amamentação contínua até os 2 anos de idade ou mais (WHO, 2015).

Considerando os benefícios que o aleitamento materno proporciona à sociedade, a OMS têm como objetivo alcançar uma prevalência de 70% de aleitamento materno exclusivo até 2030 (WHO, 2018). Entretanto, existem diversas limitações que precisam ser trabalhadas para conquistar o objetivo estipulado pela OMS. Estudos têm demonstrado que diversas variáveis influenciam na prática do aleitamento materno, tais como variáveis demográficas, socioeconômicas e aquelas associadas à assistência pré-natal e pós-natal (CALDEIRA; GOULART, 2000; SANTANA *et al.*, 2017). Dentre as variáveis associadas à assistência pós-natal, podemos considerar o período de transição, qual a mãe retorna à rotina que existia antes do nascimento da criança. No Brasil, os direitos da mulher e da criança são assegurados pela Constituição, através

da licença-maternidade de acordo com o Art. 392 da lei nº 5.452, e menos conhecida, a licença-amamentação de acordo com o Art. 396, Lei nº 5.452, que permite dois períodos diários de 30 minutos para o aleitamento materno (BRASIL, 1943a; b).

Mundialmente os índices de políticas públicas ainda são insuficientes para o sucesso da prática de amamentação exclusiva. Segundo a UNICEF, em todo o mundo, apenas 40% das mulheres com recém-nascidos têm benefícios básicos de maternidade assegurados em seu local de trabalho. Essa disparidade aumenta entre os países da África, onde apenas 15% das mulheres com recém-nascidos têm algum benefício para apoiar a continuidade do aleitamento materno (ILO, 2017). Além disto, dos países que oferecem licença parenteral, apenas 12% oferecem uma licença-maternidade remunerada apropriada (ILO, 2000). Da mesma forma que a licença remunerada ajudaria na aderência das mães à amamentação exclusiva, a disponibilidade de uma licença-maternidade mais longa resultaria em maiores chances de amamentação pelo menos nos primeiros meses (NAVARRO-ROSENBLATT; GARMENDIA, 2018). Neste contexto, no ano de 2018 apenas 4 em cada 10 crianças no mundo são exclusivamente amamentadas até os seis meses (UNICEF, 2019). Já no Brasil, a prevalência do aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida foi de 41%, segundo o último relatório sobre amamentação divulgado pelo Ministério Público em 2008 (GONÇALVES; CADETE, 2009). Portanto, o desmame precoce, prática que vai em oposição às recomendações preconizadas pela OMS, representa um importante problema de saúde pública (GALTRY, 1997). Evidências demonstram que ações governamentais são necessárias para promover políticas que garantam que todas as mães que queiram realizar o aleitamento materno, tenham apoio para seguir as melhores práticas de amamentação infantil (ROLLINS *et al.*, 2016).

## **1.2.Desmame precoce e suas consequências para a saúde: uma perspectiva de acordo com o conceito DOHaD**

O desmame é a transição da supressão da oferta do leite materno pela introdução de leites modificados e/ou alimentos na dieta da criança (PATEL; SRINIVASAN, 2011), e quando a prática ocorre antes dos seis meses de idade, é definido como desmame precoce (RODRIGUES *et al.*, 2018). Ao realizar o desmame, desafia-se o metabolismo do organismo que é exposto, pois ocorre o desligamento da dependência nutricional e comportamental mãe-filho (PATEL *et al.*, 2011). Neste contexto, torna-se importante o desenvolvimento de estudos correlacionando as consequências do desmame precoce na saúde e no desenvolvimento das crianças.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que alterações repentinas no ambiente, situações de estresse e alterações nutricionais durante os primeiros 1000 dias, qual compreende a fase desde a concepção até os dois anos de vida da criança, são períodos críticos que podem causar alterações indesejáveis que perduram até a vida adulta do indivíduo (PENTECOST; ROSS, 2019). Essas alterações podem contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias, como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, depressão e ansiedade na vida adulta (FRAGA *et al.*, 2014; GARTNER *et al.*, 2005; ILCHMANN-DIOUNOU *et al.*, 2019; KAUFMAN *et al.*, 2007; MILLER; LUMENG, 2018; MURPHY *et al.*, 2017; SYED; NEMEROFF, 2017).

Em estudos utilizando modelos animais de desmame precoce, DOS SANTOS OLIVEIRA *et al.* (2011) observaram que o desmame no dia pós-natal (PN) 15 por separação física das mães tornou os animais mais propensos a preferirem dietas ricas em gordura quando comparado com animais desmamados em PN30. Outras alterações observadas em animais desmamados precocemente incluem: o aumento da agressividade (AHOLA *et al.*, 2017; KANARI *et al.*, 2005), o aumento da ansiedade (ISHIKAWA *et al.*, 2015; KIKUSUI *et al.*, 2006;

KODAMA *et al.*, 2008) e a redução do desempenho cognitivo (POLETTTO *et al.*, 2006). Além disso, já foi demonstrado que o desmame precoce é capaz de alterar, em curto e longo prazo, parâmetros fisiológicos como peso corporal, comprimento, gordura visceral, gordura total, glicemia, níveis de insulina e leptina sérica, bem como o índice de resistência à insulina em ratos (LIMA *et al.*, 2011). Em conjunto, esses achados demonstram que o desmame precoce pode influenciar negativamente o desenvolvimento fisiológico e neurocomportamental da prole, tornando necessário o estudo dos mecanismos moleculares implicados nessas alterações.

A interação mãe-bebê é extremamente importante para a desenvolvimento cognitivo e emocional dos mamíferos. Alguns estudos demonstraram que os cuidados maternos são essenciais para um bom desenvolvimento neuronal, pois ajudam na liberação de fatores que são responsáveis pelo adequado desenvolvimento nas regiões encefálicas e no processo de neurogênese que ocorre na prole (DOS SANTOS OLIVEIRA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2000; MARAIS *et al.*, 2008). O processo de diferenciação celular de subpopulações neuronais durante o desenvolvimento tem se mostrado dependente da produção de neurotrofinas, principalmente do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) (SCHINDER; POO, 2000). Estudos têm demonstrado que a interação mãe-filhote promove a liberação do BDNF, podendo este exercer efeitos importantes sobre a cognição e o comportamento dos filhotes.

Visto a importância dos cuidados maternos sobre o amadurecimento encefálico, por outro lado, a falta de cuidado pode influenciar negativamente na prole. O desmame precoce influencia nos processos cognitivos dependentes da função do hipocampo (FRAGA *et al.*, 2014). Em um estudo realizado na Universidade de Tóquio, os pesquisadores sugeriram que o desmame precoce foi responsável pela diminuição de BDNF e, conseqüente inibição na proliferação e sobrevivência de células hipocâmpais tanto em camundongos machos quanto em fêmeas (KIKUSUI; ICHIKAWA; *et al.*, 2009). MIRESCU *et al.* (2004), observaram que o desmame

precoce foi capaz de diminuir a proliferação celular e a produção de neurônios imaturos no giro denteado do hipocampo de ratos, demonstrando uma supressão duradoura da neurogênese e diminuição da plasticidade hipocampal após a exposição ao estresse na vida adulta. No estudo de NAKAMURA *et al.* (2008), o desmame precoce no PN14 induziu comportamento do tipo ansioso em camundongos em associação com a diminuição da expressão de receptores de serotonina (5-HT-1A) no hipocampo. Camundongos desmamados precocemente apresentaram níveis basais de corticosterona mais altos do que os ratos desmamados normalmente, bem como alteração na expressão mRNA de receptores glicocorticoides (GC) no hipocampo (KIKUSUI *et al.*, 2006).

Todavia, não somente o hipocampo parece ser afetado pela falta de cuidado e leite materno, já que alterações em outras regiões encefálicas têm sido relatadas em diversos estudos sobre desmame precoce. Estudos em ratos, foi observado que o desmame precoce provocou alterações nos padrões alimentares, modificações atribuídas à diminuição de expressão de receptores de serotonina (5HT-1B e 5HT-2C) no hipotálamo (TAVARES *et al.*, 2019). Já em camundongos, a inibição da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) através da inibição da síntese de corticosterona normalizou o comportamento tipo ansioso após desmame realizado no PN14, demonstrando que a separação materna durante os últimos dias de aleitamento aumentou os níveis de ansiedade através da modulação da sinalização por GC no córtex pré-frontal (KIKUSUI *et al.*, 2019). Por fim, ISHIKAWA *et al.* (2015) demonstraram que o modelo de desmame precoce combinado com estresse crônico após o desmame, foi capaz de causar prejuízo no desenvolvimento do circuito córtex pré-frontal amígdala resultando em comportamentos semelhantes à ansiedade.

### **1.3.Memória e sua relação com estresse na primeira infância**

Considerando as alterações dos níveis de GC nos modelos de estresse na primeira infância, sabe-se que estes hormônios são liberados durante períodos de estresse e que causam



consequências no encéfalo. Eventos estressantes promovem alterações hormonais no organismo com o objetivo de preparar o indivíduo para situações perigosas ou ameaçadoras. Porém estes mediadores liberados também influenciam no aprendizado e na memória (DE QUERVAIN *et al.*, 2017; ROOZENDAAL *et al.*, 2009). Visto que algumas pessoas possuem lembranças mais vívidas sobre fatos que ocorreram quando vivenciaram acontecimentos estressantes ou emocionalmente estimulantes do que acontecimentos neutros (BOHANNON, 1988; MCGAUGH, 2003; NEISSER *et al.*, 1996).

A memória é o resultado da aquisição e armazenamento de informações adquiridas através de experiências vivenciadas, processo nomeado como aprendizado (IZQUIERDO, 2018). Estas memórias são classificadas de acordo com o tempo de duração, é definido como memória de trabalho a lembrança que dura segundos ou poucos minutos. As memórias que duram mais tempo são definidas como memórias de curta duração, que duram 0,5-6 horas, e longo prazo, que podem durar dias ou anos devido o processo chamado consolidação (PAVÃO, 2008). A consolidação, processo pelo qual a memória de curta duração é transferida para a memória de longo prazo, pode ser afetada pelos níveis de GC tanto em estudos em animais quanto em humanos (MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011). Investigações demonstram que tanto em altos níveis de GC quanto em baixos podem afetar a consolidação das memórias (OITZL; DE KLOET, 1992; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1997). Em roedores, o desenvolvimento cerebral ocorre durante as últimas semanas gestacionais e permanecem em desenvolvimento nas três primeiras semanas pós-natal (ANDRADE *et al.*, 1996), principalmente o circuito neuronal hipocampal, qual é importante no processamento da memória e aprendizado (OPITZ, 2014). Estudos demonstram que a má nutrição durante a lactação, período no qual o desenvolvimento encefálico atinge seu pico, favorece efeitos deletérios ao desenvolvimento encefálico (COUPE *et al.*, 2009; MORGANE *et al.*, 1993). FRAGA *et al.* (2011) demonstraram que a hipoprolactinemia materna no final do período de

lactação afetou a memória/aprendizagem de ratos machos na idade adulta. Porém, não somente nos âmbitos nutricionais afetam o desenvolvimento cerebral, eventos emocionalmente prejudiciais na primeira infância também afetam os processos cognitivos relacionados à memória (BOS *et al.*, 2009; FUGE *et al.*, 2014; HANSON *et al.*, 2012).

Diante disso, o desmame precoce parece induzir modificações que poderão ditar o estado de saúde e/ou a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças na infância e vida adulta (KIKUSUI *et al.*, 2006; VAN DER MEULEN *et al.*, 2010), porém os mecanismos moleculares pelos quais ocorre a programação do metabolismo para tal desfecho ainda não estão esclarecidos. Além disso, até o momento não há estudos investigando a influência do desmame precoce sobre a homeostase redox e a funcionalidade mitocondrial no sistema nervoso central (SNC).

#### **1.4.Homeostase Redox e desmame precoce**

O O<sub>2</sub> possui uma grande importância aos seres vivos, porém é considerado um gás mutagênico tóxico. Assim a maioria dos organismos possuem defesas antioxidantes para proteção contra sua toxicidade. Além disto, as reações de conversão de energia para utilizar o O<sub>2</sub> como acceptor final de elétrons no sistema de transporte de elétrons mitocondrial (STEM) foram as adaptações mais importantes entre os organismos aeróbicos (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL *et al.*, 2007).

O STEM está localizado nas membranas internas das mitocôndrias chamadas cristas, onde encontramos quatro complexos (I-IV) juntamente com a enzima ATP sintase (complexo V) formando o maquinário para produção de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*), a principal fonte de energia celular (CHABAN *et al.*, 2014). Os complexos I-IV são enzimas com multissubunidades que trabalham em conjunto para criar um gradiente eletroquímico através do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, ao final deste processo o gradiente é usado pelo complexo V para produzir ATP via fosforilação oxidativa (CHABAN *et al.*, 2014; NELSON; COX, 2017).

As mitocôndrias são as principais fontes de ATP celular, nas quais utilizam em torno de 85 a 90% do O<sub>2</sub> que as células captaram na corrente sanguínea (HALLIWELL *et al.*, 2007; HARPER *et al.*, 2004). Além disso, as mitocôndrias exercem um importante papel regulador em diversos processos celulares, como apoptose, diferenciação celular e processos adaptativos (KIM *et al.*, 2016; VAN DER BLIEK *et al.*, 2017; ZETH, 2010).

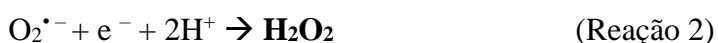
Devido à sua alta requisição celular, principalmente por ser a principal fonte de ATP, a mitocôndria tem sido considerada a principal fonte de espécies reativas, ocorrendo principalmente nos complexos I e III, devido ao vazamento de elétrons fornecidos para o STEM (CHANCE *et al.*, 1979; HANSFORD *et al.*, 1997; HARPER *et al.*, 2004).

As espécies reativas são moléculas que em sua grande maioria possuem alta reatividade, e podem ser divididas quimicamente em dois grupos: os radicais livres e os agentes oxidantes não radicalares. Radicais livres são classificados como moléculas que possuem um ou mais elétrons não emparelhados na sua última camada eletrônica. Os compostos não radicalares não possuem elétrons livres, sendo menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas adjacentes sendo facilmente convertidos a compostos radicalares (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Essas espécies podem ser originadas através de reações com alguns elementos, tais como oxigênio, nitrogênio, cloro, bromo e enxofre; entretanto os de maior relevância biológica são as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (CAROCHO; FERREIRA, 2013; DE TULLIO; ASARD, 2012).

As espécies reativas atuam nas células como moléculas sinalizadoras capazes de regular diversas funções fisiológicas, alterando reações celulares, como síntese de ATP, fagocitose, regulação de crescimento celular e síntese de mensageiros secundários (BABIOR, 2000; RECZEK; CHANDEL, 2015; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; TRUONG; CARROLL, 2013; ZHANG *et al.*, 2019). Entretanto as espécies reativas também são consideradas subprodutos

tóxicos no metabolismo aeróbico. Os efeitos tóxicos das espécies incluem a peroxidação dos lipídios de membrana e oxidação de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (HUSAIN *et al.*, 1987). Cada espécie reativa possui suas características biofísicas particulares que irão ditar seu poder de dano celular, tais como taxa de difusão, meia-vida e permeabilidade celular (SIES, 1997).

O ânion superóxido é o produto da reação de um elétron com o oxigênio (Reação 1), ele reage com poucas moléculas não-radicalares, porém mais rapidamente com outros radicais (SCHWARZLANDER; FINKEMEIER, 2013). A atividade mitocondrial é a principal fonte de  $O_2^{\bullet-}$ , através do vazamento de elétrons nos complexos I e III, os elétrons são captados pelo  $O_2$  presente no meio biológico, formando assim o ânion superóxido (MURPHY, 2009). Apesar de suas propriedades físico-químicas, concentrações elevadas de  $O_2^{\bullet-}$  podem ser prejudiciais para as biomoléculas, principalmente pelos seus produtos secundários (FRIDOVICH, 1995). Portanto há necessidade de regular as concentrações de superóxido, e essa função é realizada pela enzima superóxido-dismutase (SOD) (BIRBEN *et al.*, 2012). Nesta reação de oxidação-redução, ocorre a dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  (Reação 2) (NORDBERG; ARNER, 2001).



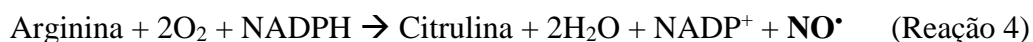
O peróxido de hidrogênio, uma molécula não radical, com propriedade estável e seletiva sobre as reações biológicas com espécies não radicais (HALLIWELL *et al.*, 2007). Além da enzima SOD, o  $H_2O_2$  pode ser formado através de reações catalisadas por oxidases em diferentes locais celulares, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático e citosol ou na via da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos (CHANCE *et al.*, 1979). Embora o  $H_2O_2$  seja bastante seletivo e com uma baixa reatividade, esta molécula pode ser convertida em radicais altamente reativos através de interações com metais de transição, que são substâncias abundan-

tes no ambiente celular (BARREIROS *et al.*, 2006; HALLIWELL, 2006). Essas reações produzem o radical  $\cdot\text{OH}$ , a espécie mais danosa entre as ERO. Para o controle da concentração do peróxido de hidrogênio, afim de evitar formação de hidroxil, as enzimas catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) e tioredoxinas (Trx) são responsáveis pela sua eliminação (LUSHCHAK, 2014).

O radical hidroxil possui alta reatividade biológica devido a sua meia-vida muito curta ( $10^{-9}$  s), reagindo rapidamente com quase todas as biomoléculas (BABIOR, 2000). Além disso, a ausência de defesa antioxidante enzimática capaz de eliminá-lo faz desta espécie mais nociva entre as ERO (BARCELLOS, 2015). Para controlar a concentração do radical  $\cdot\text{OH}$  podem-se utilizar defesas antioxidantes não enzimáticas, reparar os efeitos danosos causados nas biomoléculas e inibir a sua formação (BARREIROS *et al.*, 2006). A reação de Fenton (Reação 3) é a principal fonte do radical hidroxil (HALLIWELL, 2006)



O óxido nítrico é um gás, conferindo permeabilidade às membranas (POLTRONIERI *et al.*, 2014; THOMAS, 2015). O NO é produzido principalmente pela ação da enzima óxido-nítrico-sintase (NOS), a qual possui três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) (Reação 4) (RICCIARDOLO *et al.*, 2006). O óxido nítrico é considerado um dos mais importantes mediadores de processos intracelular e extracelular, desempenhando funções de neurotransmissão, defesa contra patógenos, citoproteção e vasodilatação endotelial (LUNDBERG *et al.*, 2008; RÖSZER, 2012).



O  $\text{NO}\cdot$  reage com quase todas biomoléculas, porém sua interação com proteínas é a interação mais comum (CHAKI; LINDERMAYR, 2014). Através da nitrosilação e nitração, produzindo reações reversíveis e irreversíveis, respectivamente, o radical óxido nítrico pode alterar funções proteicas (HALLIWELL *et al.*, 2007; POLTRONIERI *et al.*, 2014). Entretanto,

o NO<sup>•</sup> sozinho não é suficientemente reativo para atacar o ácido desoxirribonucleico (DNA) diretamente (BARREIROS *et al.*, 2006), mas pode reagir com o radical ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, gerando uma espécie tóxica chamada peroxinitrito (Reação 5) (PRYOR; SQUADRITO, 1995).



O ânion ONOO<sup>-</sup> é uma espécie não radicalar, estável e permeável às membranas biológicas. Após sua formação, apesar de possuir um tempo de meia-vida curta (<10<sup>-3</sup> s), o peroxinitrito pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de causar danos ao DNA, oxidação de lipídios e nitração de porções de aminoácidos aromáticos na estrutura das proteínas (BARCELLOS, 2015; RADI *et al.*, 2001). Devido sua estabilidade ONOO<sup>-</sup> pode interagir de forma irreversível com estas biomoléculas conferindo uma característica tóxica (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

As espécies reativas são de extrema importância celular, contudo seus níveis devem ser controlados para evitar danos celulares, assim sua eliminação é realizada pelos antioxidantes (HALLIWELL, 2011). Os antioxidantes compreendem uma série de compostos enzimáticos e não enzimáticos, que podem ter origem no próprio organismo ou podem ser adquiridos através da dieta (BARREIROS *et al.*, 2006).

O sistema enzimático, tem maior eficiência na neutralização e destoxificação das espécies reativas do que o sistema não enzimático. As enzimas atuam sobre ERO e ERN para transformá-las em espécies menos tóxicas (BARCELLOS, 2015). Existem diversas enzimas antioxidantes que protegem as células dos excessos de espécies reativas, porém três enzimas são mais relevantes: superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona-peroxidase (GPx) (BARCELLOS, 2015; BARREIROS *et al.*, 2006).

A SOD (EC 1.15.1.1) controla os níveis de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Esta enzima catalisa a eliminação do radical ânion superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Reação 6).

Além de controlar os níveis de  $O_2^{\bullet-}$ , a SOD também regula a concentração de  $ONOO^-$  pois ela compete com o  $NO^{\bullet}$  pelo  $O_2^{\bullet-}$  (OLSON *et al.*, 2018).



A CAT (EC 1.11.1.6) é responsável por converter o  $H_2O_2$  em oxigênio e  $H_2O$  (Reação 7). Em mamíferos, a CAT é encontrada predominantemente nos peroxissomos (ALI *et al.*, 2020; HALLIWELL *et al.*, 2007).



O terceiro sistema enzimático é formado pelas enzimas glutathione-peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) e glutathione-redutase (GR), juntamente com o componente não enzimático, glutathione reduzida (GSH); que eliminam o  $H_2O_2$  fora dos peroxissomos. A GPx também atua na remoção de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e  $ONOO^-$  (BRIGELIUS-FLOHE; MAIORINO, 2013; HALLIWELL *et al.*, 2007). A GPx reduz o peróxido de hidrogênio água (Reação 8), oxidando o substrato GSH (ALI *et al.*, 2020; BABIOR, 1997). A GSH é um tripeptídeo sintetizado pela  $\gamma$ -glutamylcisteine-ligase e glutathione-sintetase no citoplasma (HALLIWELL *et al.*, 2007). Durante a reação da GPx, duas moléculas de GSH são oxidadas formando uma ponte de dissulfeto, convertendo GSH em glutathione oxidada (GSSG). Após a oxidação, a GSH pode ser regenerada pela enzima GR (EC 1.6.4.2) (Reação 9) (BARCELLOS, 2015).



A glicoxalase 1 (GLO1) (EC 4.4.1.5) também pode ser considerada uma enzima que auxilia a eliminação de espécies tóxicas às biomoléculas. Essa enzima faz parte do sistema enzimático das glicoxalases que convertem  $\alpha$ -cetoaldeídos em D-hidroxiácidos (HONEK, 2015). A GLO1 não atua sobre as espécies reativas especificamente, sua função é a remoção indireta do subproduto glicolítico não enzimático metilglicoxal (MG), sendo através da eliminação de hemitioacetal, o composto formado através da reação da GSH com o MG (THORNALLEY,

1996). O MG, um produto do metabolismo da glicose e da frutose, é um composto altamente reativo, sendo um potente agente de glicação, reagindo principalmente com proteínas, lipídios e DNA, produzindo produtos finais de glicação avançada (AGE) (AGE, do inglês *advanced glycation end-products*) que induzem processo inflamatório e estresse oxidativo (MAESSEN *et al.*, 2015; THORNALLEY, 1996).

O sistema antioxidante não enzimático é composto por moléculas de baixo peso molecular que controlam o dano causado pelas espécies reativas com menor eficiência. Esses compostos compreendem os carotenoides, a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico. Provenientes da dieta, os tocoferóis (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) são as vitaminas mais importantes na defesa contra as espécies reativas (BABIOR, 1997; REZAYIAN *et al.*, 2019).

Entretanto, quando todos estes sistemas são insuficientes para combater as espécies reativas, ocorre o desequilíbrio redox. O desequilíbrio é estabelecido quando há um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e/ou incapacidade do organismo de neutralizar suas ações pelos sistemas de proteção antioxidantes, o acúmulo destas substâncias reativas culmina em danos às biomoléculas, definindo um estresse oxidativo celular (BARCELLOS, 2015; PERSSON *et al.*, 2014; SIES, 1985). O estresse oxidativo instaurado produz uma série de distúrbios de sinalização celular promovendo danos moleculares (JONES, 2006). Os danos produzidos através da oxidação das biomoléculas são causados pela reatividade das espécies reativas, levando à modificação de suas estruturas, e em última análise, alterações nas funções biológicas. As consequências do estresse oxidativo nas estruturas celulares dependem do tipo celular e da severidade do dano oxidativo, assim na falta de adaptações celulares e impossibilidade da recuperação e substituição das biomoléculas afetadas, o dano oxidativo pode resultar em morte celular (BARCELLOS, 2015; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; SRIVASTAVA; KUMAR, 2015).



A dificuldade de avaliar diretamente a concentração de espécies reativas prejudica a mensuração do estresse oxidativo celular, principalmente devido a suas características biofísicas e interações com o ambiente celular, assim tem sido usado amplamente medidas indiretas do dano para investigar o estresse oxidativo. Os principais marcadores são as oxidações de biomoléculas como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. A oxidação leva à formação de metabólitos específicos nos quais são identificados e mensurados para ajudar no entendimento do estresse oxidativo celular (BARCELLOS, 2015; HALLIWELL *et al.*, 2007; HALLIWELL *et al.*, 2004).

Quando recorrente e persistente, o estresse oxidativo pode causar danos crônicos às biomoléculas, tendo sido associados a diversas patologias, inclusive doenças que afetam o SNC (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). Um dos principais motivos é a acentuada produção de espécies reativas nos neurônios, principalmente devido ao alto consumo de oxigênio e glicose no cérebro. Alta demanda de ATP combinado com alterações na funcionalidade mitocondrial e aumento de geração de espécies reativas resulta em uma maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de patologias neurológicas (ANGELOVA *et al.*, 2018; GANDHI; ABRAMOV, 2012).

A maioria dos estudos publicados investigam efeitos do desmame precoce sobre a homeostase redox em intestino de leitões. Recentemente foi demonstrado que o desmame precoce foi capaz de alterar o estado redox no intestino delgado de leitões, evidenciado pela redução da atividade da enzima SOD e da capacidade antioxidante total; além da diminuição da expressão de genes relacionados à biogênese e função mitocondrial, das enzimas ATP sintase e citocromo *c* oxidase e do citocromo *c*; bem como, a redução do conteúdo do DNA mitocondrial (HUANG *et al.*, 2017). Em outro estudo, os resultados demonstram que leitões desmamados precocemente apresentaram alterações em proteínas envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico, na  $\beta$ -oxidação e na via da glicólise nas vilosidades no intestino delgado (XIONG *et al.*, 2015).

Uma vez que o cérebro é considerado o órgão mais vulnerável ao estresse oxidativo quando comparado aos demais órgãos, alterações na produção de espécies reativas e no sistema de defesa antioxidante durante períodos críticos de vulnerabilidade podem comprometer o seu desenvolvimento (HALLIWELL, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Contudo, as possíveis alterações que o desmame realizado precocemente pode exercer sobre o estado redox no SNC não foram elucidadas até o momento.

### **1.5. Justificativa**

Diante do baixo índice de lactentes amamentados pelo tempo preconizado pela OMS combinado com a escassez de estudos sobre possíveis alterações no encéfalo de mamíferos submetidos ao desmame precoce, torna-se importante para a saúde pública o desenvolvimento de estudos correlacionando as consequências do desmame precoce sobre o encéfalo da prole. Visto que uma das limitações dos estudos clínicos é observar os efeitos das intervenções sobre o SNC dos indivíduos, os estudos em modelos animais vêm contribuindo para o esclarecimento de diversos mecanismos celulares e moleculares.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar possíveis alterações comportamentais e moleculares no encéfalo da prole de ratos Wistar submetidos ao modelo de desmame precoce.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Verificar o desenvolvimento corporal dos filhotes desmamados precocemente desde o 16º dia pós-natal até o 60º dia.

Verificar a funcionalidade mitocondrial no hipocampo e no hipotálamo da prole de ratos submetidos ao modelo de desmame precoce, por meio da avaliação da massa e potencial de membrana mitocondrial;

Avaliar possíveis alterações do estado redox no hipocampo e no hipotálamo da prole de ratos submetidos ao modelo de desmame precoce por meio da avaliação dos níveis de espécies reativas, oxidação de DCFH, óxido nítrico e o superóxidomitocondrial ;

Avaliar possíveis danos moleculares no hipocampo e no hipotálamo da prole de ratos submetidos ao modelo de desmame precoce por meio da avaliação da peroxidação lipídica;

Avaliar possíveis alterações nos parâmetros antioxidantes no hipocampo e no hipotálamo da prole de ratos submetidos ao modelo de desmame precoce avaliando a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GLO1;

Avaliar parâmetros comportamentais em machos e fêmeas submetidos ao modelo de desmame precoce por meio de testes de campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em Y e labirinto em cruz elevado.

Avaliar os efeitos específicos ao sexo sobre os parâmetros comportamentais e moleculares.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Capítulo I**

Neste capítulo apresentamos os resultados desta dissertação, que levaram à elaboração de um artigo científico. Aqui demonstramos que o desmame precoce alterou a homeostase redox no encéfalo da prole em filhotes fêmeas e machos aos 21 dias de vida. Além disso, mostramos que o desmame precoce foi capaz de alterar a memória de longa duração avaliada pelo teste de reconhecimento de objeto e o comportamento tipo ansioso pelo teste de labirinto em cruz elevado nos filhotes machos aos 60 dias de vida.

Autores: Karoline dos Santos Rodrigues, Caroline Peres Klein, Pauline Maciel August, Bernardo Gindri dos Santos, Régis Mateus Hözer, Rafael Moura Maurmann, Mariana Crestani Scortegagna, Juliana Bender Hoppe e Cristiane Matté.

Status do artigo científico: Este artigo será submetido ao periódico *International Journal of Developmental Neuroscience*.

**Sex-specific modulation of redox status  
in the rat brain of pups induced by early weaning**

Karoline dos Santos Rodrigues<sup>a</sup>, Caroline Peres Klein<sup>b</sup>, Pauline Maciel August<sup>a</sup>,  
Bernardo Gindri dos Santos<sup>a</sup>, Régis Mateus Hözer<sup>a</sup>,  
Rafael Moura Maurmann<sup>b</sup>, Mariana Crestani Scortegagna<sup>b</sup>,  
Juliana Bender Hoppe<sup>b</sup>, Cristiane Matté<sup>a,b,c</sup>

**Authors' affiliation**

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding author:**

Cristiane Matté

E-mail: [matte@ufrgs.br](mailto:matte@ufrgs.br)

Phone: +55 51 3308 5548, Fax: +55 51 3308 5535

Adress: Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil

Zip Code: 90035-003

## **Highlights**

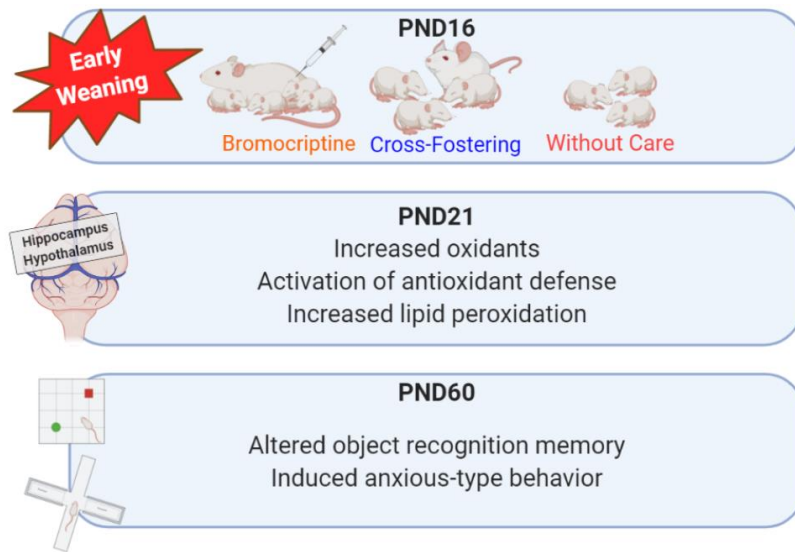
- Early weaning affected negatively pups' body weight.
- Early weaning was able to change the redox state in the pups' brains.
- Pharmacologically early-weaned male pups presented memory impairment.
- Female and male offspring were affected differently by early weaning.

## **Abstract**

Exposure to environmental factors can program the metabolism, conferring resistance or increasing the risk to chronic diseases development in childhood and adulthood. In this sense, lactation is an important period in this window of development. Herein, we investigated the effect of early weaning on neurochemical and behavioral changes in offspring at weaning and adulthood. Female and male pups were divided into 4 groups: 1. Control weaning (weaning on the PND21, pups were kept with the biological mother); 2. Early Weaning Bromocriptine group (EWB) (pharmacological weaning on PND16); 3. Early Weaning Cross-Fostering group (EWCF) (pups housed with a foster mother on PND16 up to PND21); 4. Early Weaning Without Care group (EWWC) (weaning on PND16, maternal separation). Weight control of pups were recorded from postnatal day 16 to 59. On the 21<sup>st</sup> day, part of the pups were euthanized and the hippocampus and hypothalamus were removed for biochemical evaluation. The remaining pups were submitted to behavioral tests on the 60<sup>th</sup> postnatal day. Early weaning reduced the pups' body weight, in sex-dependent way. At 60 days of age, male pups of EWCF and EWWC groups have lower body weight compared to control male, and female body weight was lower than male pups. In relation to biochemical changes in the brain, weaning altered the levels of oxidants, increased the enzymatic activity of SOD and GPx, as well as induced lipid peroxidation. Weaning was also able to alter long-term memory evaluated and induce anxious behavior in pups. Our results demonstrate that the different types of early weaning changed the parameters of redox status in the hippocampus and hypothalamus of pups (21 days-old), suggesting a prooxidative profile, in addition to alter learning/memory and inducing an anxious behavior in male offspring (60 days-old).

**Keywords:** DOHaD; Early weaning; Metabolic programming; Redox status.

## Graphical Abstract





## 1. Introduction

The first 1000 days of life, a phase that extends from conception to two years of age, is a critical period for development. The concept of Developmental Origins of Health and Disease research (DOHaD) defines that health and disease risk development in the next generations is affected by the parental environmental milieu. In this context, we and other groups have shown that events occurring during the development period may positively or negatively influence health throughout life (Agosti *et al.*, 2017; August *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2018; Langley-Evans, 2015). Negative insults such as malnutrition early in life can influence the metabolic programming of the individual, and may lead to the development of non-communicable diseases such as diabetes, cardiovascular disease, cancer, and chronic respiratory diseases (Agosti *et al.*, 2017; Bass *et al.*, 2015; Hanson *et al.*, 2009).

From birth to at least six months of age the breastfeeding is the utmost choice to newborn's adequate nutrition, as highly recommended by the World Health Organization (WHO, 2015). Breast milk along with maternal care ensures a better development, considering cognitive, brain, social, and emotional development of children (Krol *et al.*, 2018). Despite all efforts, only 37% of babies under 6 months receive exclusive breastfeeding in low- and middle-income countries (Victora *et al.*, 2016). Early weaning is characterized by the introduction of any kind of food in a child's diet before 6 months of age (Rodrigues *et al.*, 2018). The path of early weaning, by choice or imposition, has become a public and a socioeconomic health concern (Rollins *et al.*, 2016; Victora *et al.*, 2016), considering the long-term health impact.

The early weaning can significantly influence the physiological, behavioral and nutritional development of the offspring. Rodents exposed to early weaning showed hyperlocomotor activity and stress vulnerability (Ishikawa *et al.*, 2014), disruption in the monoaminergic neuron axons development (Ishikawa *et al.*, 2013), and impairment in the medial prefrontal cortex circuit-

amygdala development resulting in anxiety-like behaviors (Ishikawa *et al.*, 2015). In addition, weaning by physical separation from mothers altered dietary preference (dos Santos Oliveira *et al.*, 2011) and significantly affect the intestinal mucosa (Crispel *et al.*, 2019). In piglets, early weaning was able to increase reactive species and malondialdehyde levels, to reduce superoxide dismutase (SOD) activity and the concentration of PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), which plays an important role in regulating mitochondrial antioxidant expression (L. H. Zhu *et al.*, 2012).

Essential to cellular homeostasis and survival, mitochondrial function is related to several vital biological processes, such as ATP production through oxidative phosphorylation (Chaban *et al.*, 2014; Hock *et al.*, 2009). Incomplete oxygen reduction results in reactive oxygen species (ROS) production (Holzerova *et al.*, 2015), that has a dual function, being damaging in high concentration and essential for some physiological processes like inflammatory defense and cell signaling (Holmstrom *et al.*, 2014; Holzerova *et al.*, 2015; Mittler, 2017; Reczek *et al.*, 2015; Schieber *et al.*, 2014). Due to its reactive chemical property, the formation of species needs to be balanced by antioxidant systems, which prevent their cellular accumulation and protect against the oxidative damage. The systems are responsible for remove species and are composed of enzymatic and non-enzymatic antioxidants (Barreiros *et al.*, 2006; Baxter *et al.*, 2016; Pi *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2010). When the redox homeostasis is unbalanced and ROS levels are increased above basal levels, they can interact with biomolecules, leading to mitochondrial dysfunction and oxidative stress (Choksi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008; Murphy, 2006). These conditions are related to several neurological disorders such as depression (Allen *et al.*, 2018), schizophrenia (Rajasekaran *et al.*, 2015), epilepsy (Pearson-Smith *et al.*, 2017), and anxiety caused by social isolation (Mumtaz *et al.*, 2018).

Some neurological diseases present alterations in the modulation of the glucocorticoid system, in which it is closely linked to the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis (Joels, 2018). Similarly, early life stress is also capable of modulate the endocrine system, mainly because it is a period of high neuroplasticity (Agorastos *et al.*, 2018; Cohen *et al.*, 2012; Kuhlman *et al.*, 2017). Some studies have shown that stressful events can modulate brain structure and function and may even lead to cognitive impairment (de Kloet *et al.*, 2005; Lupien *et al.*, 2009). Interestingly in rodents early weaning was able to increase HPA activity, a marker of physiological stress (Kikusui *et al.*, 2006). In addition, several animal model studies have shown behavioral changes such as increased anxiety-like behaviors and aggression (Kanari *et al.*, 2005; Kikusui *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2008). Furthermore, Kikusui *et al.* (2019) demonstrated that inhibiting HPA activity normalized anxiety-like behavior in animals in adulthood, indicating that alteration in HPA alters anxiety in early-weaned rats.

Weaning is one of the most important periods in the life of mammals, so studies show that when performed early, it can modulate physiological homeostasis, including behavioral and metabolic responses (Yu *et al.*, 2019). In addition, considering that the brain is the organ most vulnerable to negative changes in homeostasis during critical periods of vulnerability and may compromise its development (B. Halliwell, 2001; Barry Halliwell *et al.*, 2007), we aimed to evaluate if early weaning can bring changes in the redox homeostasis in the rat brain, as well as alter some behavioral parameters. We evaluated the hippocampus and hypothalamus because, in addition to being two structures with high plasticity and development during early childhood, they are also related to providing response to stressors in adulthood (Pervanidou *et al.*, 2018).

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animals and Ethics**

Fifty-two pregnant Wistar rats were obtained from the breeding colonies of the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. The animals were housed on the Departamento de Bioquímica (UFRGS) under controlled light-dark cycles (12h/12h), at constant temperature ( $22 \pm 1$  °C), humidity (50 - 60%), and had access to a 20% w/w protein commercial chow (CR1 lab chow, Nuvilab Ltda., Curitiba, Brazil) and water ad libitum. Pregnant rats were housed in four per cage (approximately 41 x 34 x 16 cm). On the 20<sup>th</sup> day of gestation, the rats were individually relocated in the housing boxes and were observed twice a day (9:00 and 18:00) to verify litter's birth. The litter was maintained under maternal care according to the weaning protocol.

All the experimental procedures were approved by the local Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA/UFRGS) under the protocol number 35628, and were conducted according to the National Animal Rights Regulations (Law 11.794/2008), the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23, revised 1996) and Directive 2010/63/EU. We certify that all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### **2.2. Experimental design**

The study design is depicted in Figure 1. On PND16, the litter of each dam was randomly divided into four groups according to the weaning type: 1. Control weaning (weaning on the PND21, pups were kept with the biological mother); 2. Early Weaning Bromocriptine group (EWB) (pharmacological weaning on PND16); 3. Early Weaning Cross-Fostering group

(EWCF) (pups housed with a foster mother on PND16 up to PND21); 4. Early Weaning Without Care group (EWWC) (weaning on PND16, maternal separation).

On PND21, one male and one female from each litter were euthanized by decapitation without anesthesia. The hippocampus and hypothalamus were dissected and immediately used for flow cytometry or stored at -80 °C for the biochemical assays. The other group of pups were relocated to housing boxes according to the sex in a number of 3-4 pups per cage up to adulthood. On PND60, two males and two females from each litter performed the following behavioral tasks: open field test (on PND58), object recognition test (from PND60 to PND61), Y-maze test (PND75), and elevated plus-maze test (PND76). The body weight of these animals was monitored daily, from PND16 until PND59. The number of animals used in each analyze is showed in the legends of figures.

### **2.3. Weaning models**

Early weaning with Bromocriptine (EWB): on PND16 pups, the lactating dams received two daily doses (9:30 a.m. and 4:30 p.m.) of 1 mg/Kg bromocriptine (Parlodel®, Novartis, São Paulo, SP, Brazil), dissolved in 50% ethanol: 50% saline, intraperitoneally during 5 consecutive days. The pups were kept with its biological mother up to PND21 (Millar *et al.*, 1999).

Early weaning with Cross-Fostering (EWCF): on PND16, the litters were weaned by cross-fostering. The pups were separated from its biological mother and were co-housed with a virgin female Wistar rat of 90-days-old, the foster mother (Iwata *et al.*, 2007) up to PND21.

Early weaning without Care (EWWC): on PND16, the litters were weaned by separated from its biological mother and co-housed alone (Kikusui *et al.*, 2009). To ensure the feeding of the pups, pellets of chow moistened with water were placed inside the housing box, for pups having free access to the chow.

In the control group, the litter was breastfed by its biological mother up to standard weaning day that occurs on the PND21. It is important to highlight that all pups kept with its biological or foster mother had access to standard chow, just as they were available to the mothers.

## **2.4. Biochemical assays**

### **2.4.1. Sample preparation**

For flow cytometry, the hypothalamus and the hippocampus were rapidly dissected and 100 mg of fresh tissue were dissociated in 1 mL of phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4, containing 1 mg% collagenase IV. Dissociated tissue was centrifuged at 1,500 g for 5 min, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended, filtered and incubated at 37 °C with fluorescent probes.

For biochemical assays, the hypothalamus and the hippocampus were rapidly dissected, weighed and immediately frozen (-80 °C) until homogenization (1:10 w/v in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl). Tissue homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4 °C, the pellet containing to the nuclei and cell debris was discarded, and the supernatant was taken for the assays.

### **2.4.2. Flow cytometry**

Nitric oxide levels were measured using 10 µM 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM®; Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA) (Stone *et al.*, 2019), and lipid peroxidation levels were measured using 10 µM 4,4-difluoro-3a,4adiaza-s-indacene (BOD-IPY®; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR). A count of 30,000 events was acquired per sample in a BD FACSCalibur Flow Cytometry System (San Jose, CA, USA). Data were analyzed using the software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### **2.4.3. Antioxidant enzymes activity**

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity was evaluated by quantifying the inhibition superoxide-dependent autoxidation of epinephrine, verifying the absorbance of the samples at 480 nm. The SOD activity was expressed as the amount of enzyme that inhibits the oxidation of epinephrine by 50%, which is equal to 1 unit. The data were expressed as units/mg protein (Misra *et al.*, 1972).

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activity was assayed by measuring the decrease of absorbance at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100 and 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. One CAT unit is defined as 1 µmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity was represented as units/mg protein (Aebi, 1984).

Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) activity was measured using tert-butyl hydroperoxide as a substrate. NADPH disappearance was monitored spectrophotometrically at 340 nm in a medium containing 2mM reduced glutathione (GSH), 0.15 U/mL glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7), 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide, and 0.1 mM NADPH. One GPx unit is defined as 1 µmol of NADPH consumed per minute and the specific activity was represented as units/mg protein (Wendel, 1981).

Glyoxalase 1 (GLO1, EC 4.4.1.5) activity was assessed by the initial velocity of the formation of S-D-lactoylglutathione from methylglyoxal and GSH at 240 nm (McLellan and Thornalley, 1989). One GLO1 unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 µmol of S-D-lactoylglutathione per minute and the specific activity was represented as units/mg protein (McLellan *et al.*, 1989).

#### **2.4.5. Protein concentration assay**

Protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as a standard.

## **2.5. Behavioral tests**

The behavioral tests were performed from 8 a.m. to 6 p.m. in an environment with attenuated sound and light (12 lux). Before each test start, the animals were allowed to habituate to the testing room for 1 hour.

At the beginning and the end of each test, the apparatus and objects were cleaned with 10% (v/v) ethanol in order to eliminate any olfactory track to the next use. Behavioral tests data were collected using a video-tracking system (Anymaze, Stoelting, Woods Dale, IL) using a camera.

### **2.5.1. Open field test**

The open field test was used to evaluate the exploratory and locomotor behavior. Rats were evaluated individually and their behavior was recorded for 5 min. The apparatus consisted of a wood box divided equally into 12 quadrants (60 cm length x 60 cm width x 60 cm deep). The total distance traveled, the number of crossed lines and the time spent in the center and periphery of the apparatus were measured (Netto *et al.*, 1986).

### **2.5.2. Novel object recognition**

The object recognition test consisted of three phases (habituation, training and test session) and was used to assess learning and long-term recognition memory of animals. The test is based on the tendency of animals to interact with new or familiar objects. The open field test consisted in the habituation phase for the object recognition test, which was conducted in the same apparatus. In the training session, performed 24 hours later the habituation, the animals were placed in the apparatus with two identical objects (A and A') to freely explore them. In the test session, 24 hours after training, one of the objects was replaced by a new object (B) and the animals were allowed to explore them. Each session lasted 5 min. Object exploration was defined when the animal directed the nose to the object at a maximal distance of 2 cm, sniffed or touched the



object. Climbing onto the object, unless the rat sniffed it, was not considered exploration (Klein *et al.*, 2019). The object discrimination index, which represents a memory index, was analyzed by the time spent exploring each object (in seconds) and calculated using following formula:  $[(B) / (A + B)]$ , each letter in the formula corresponds to the abovementioned object (Ennaceur *et al.*, 1988; Zou *et al.*, 2006).

### **2.5.3. Y-Maze test**

The Y-Maze test was used to assess spatial memory. The test is based on spontaneous alternation, in which the animals tend to entry less in a recent visited zone. The apparatus consisted of three identical "Y" shaped arms (40 cm length x 7 cm width x 12 cm height) at an angle of 120°. The animals were positioned individually in the center of the apparatus and were left to freely explore for 8 min (first 2 min for habituation and the other 6 for the test). A complete entry was considered when the animal had all paws within the arm. The percentage of spontaneous alternation was calculated by the following formula:  $Ae = (\text{number of alternations performed} / \text{chance of performing an alternation} - 2) * 100$  (Maurice *et al.*, 1994).

### **2.5.4. Elevated plus-maze test**

The elevated plus-maze was used to assess the anxiety-like behavior. The apparatus consisted of two opposite open arms (50×10 cm), two enclosed arms (50×10 cm, with a wall 40 cm high), an open square (10×10 cm) in the center, and a pedestal at 50 cm high from the ground. The animals were placed in the center facing the open arm, and their behavior was video-recorded for 5 min. The frequency of entry into the open and enclosed arms, and the time on each arm were measured (Carobrez *et al.*, 2005).

## **2.6. Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All data were tested for normality using Shapiro-Wilk test. Data points outside the 95% confidence interval were treated as outliers and were excluded from the data analysis. Two-way ANOVA was used to analyze the effects of early weaning and sex. Post hoc analysis was carried out using Tukey's test. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1. Offspring's weight outcomes after early weaning**

Along post early weaning days, the different types of early weaning affected negatively pups' body weight [F (5, 725) = 1.891;  $p < 0.0001$ ], and differences were also observed between females and males [F (7, 145) = 7.823;  $p < 0.0001$ ] (Fig. 2A). Body weight of pups from EWWC and EWCF groups was significantly lower than both female and male pups from control group, on PND17 up to PND21 for females, and on PND18 up to PND21 for males.

Analyzes from PND28 up to PND60 indicated differences between early-weaned groups [F (7, 623) = 2.764;  $p < 0.0001$ ]. Starting on PND45 up to PND60 male pups from EWWC and EWCF groups presented lower body weight than male pups of EWB and control groups. We observed that female pups of EWWC and EWCF groups had lower body weight than females of control group only on PND60. Differences between sex was also observed [F (7, 89) = 26.84;  $p < 0.0001$ ]. On PND35, female pups' body weight of EWCF and EWB was significantly lower than control male. For all groups, as expected, female pups presented lower body weight compared to male pups since PND41 up to PND60.

On PND21, pups' weight gain of EWWC and EWCF groups was significantly lower than pups of control group [ $F(3, 151) = 65.06$ ;  $p < 0.0001$ ], but no differences between sex was observed [ $F(1, 151) = 2.014$ ;  $p = 0.1579$ ] (Fig. 2C).

On PND60 (Fig. 2D), early weaning altered significantly pups' weight gain [ $F(3, 141) = 8.187$ ;  $p < 0.0001$ ], which was also different between female and male pups [ $F(1, 141) = 505.9$ ;  $p < 0.0001$ ] (Fig. 2D). Male pups gained more weight than female. The weight gain of male pups from EWWC and EWCF groups was significantly lower than male pups from EWB and control groups.

### **3.2. Early weaning altered reactive species levels in the brain of female and male pups**

We measured the levels of reactive species by the oxidation of DCFH, and the levels of the specific reactive species nitric oxide (Fig. 3). In the hippocampus, neither early weaning nor sex altered the levels of DCFH oxidation [ $F(3, 51) = 0.5508$ ;  $p = 0.649$  and  $F(1, 51) = 0.035$ ;  $p = 0.851$ , respectively], and no interaction between the factors was observed [ $F(3, 51) = 1.783$ ;  $p = 0.162$ ] (Fig.3A). In the hypothalamus, early weaning did not alter the levels of DCFH oxidation [ $F(3, 50) = 0.732$ ;  $p = 0.538$ ], but it was observed an effect of sex [ $F(1, 50) = 20.69$ ;  $p < 0.0001$ ], in which the levels of DCFH oxidation increased in female pups compared to male pups. Furthermore, an interaction between the factors, weaning type vs sex [ $F(3, 50) = 3.152$ ;  $p = 0.033$ ], indicated that DCFH oxidation levels increased in the hypothalamus of female pups of early weaned groups in comparison to female pups of control group, it reduced in male pups of early weaned groups in comparison to male pups of control group (Fig.3B).

Regarding hippocampal levels of nitric oxide, we observed an increase in male pups from EWB group compared to control group [ $F(3, 41) = 3.278$ ;  $p = 0.030$ ]. No effect of sex [ $F(1, 41) = 0.156$ ;  $p = 0.695$ ] or interaction [ $F(3, 41) = 2.193$ ;  $p = 0.103$ ] were observed (Fig. 3C). In the hypothalamus, we observed that nitric oxide levels of males group were lower than females

group [ $F(1, 50) = 4.680$ ;  $p = 0.035$ ]. No effect of weaning type [ $F(3, 50) = 0.764$ ;  $p = 0.519$ ] and no interaction was observed [ $F(3, 50) = 1.233$ ;  $p = 0.307$ ] in the hypothalamus of pups (Fig. 3D).

### **3.3. Early weaning altered lipid peroxidation in the brain of male pups**

We measured the lipid peroxidation by a specific probe using flow cytometry (Fig. 4). In the hippocampus, early weaning did not alter the lipid peroxidation [ $F(3, 49) = 0.794$ ;  $p = 0.503$ ], but male pups groups presented reduced levels of lipid peroxidation compared to female pups [ $F(1, 49) = 5.235$ ;  $p = 0.026$ ]. No interaction between the factors was observed [ $F(3, 49) = 0.891$ ;  $p = 0.452$ ] (Fig. 4A). In the hypothalamus, we observed that lipid peroxidation increased in male pups from EWCF and EWWC groups compared to male control pups [ $F(3, 50) = 5.564$ ;  $p = 0.002$ ], and compared to female pups of all groups [ $F(1, 50) = 20.97$ ;  $p < 0.0001$ ]. There was also an interaction between the factors, weaning vs sex [ $F(3, 50) = 3.593$ ;  $p = 0.020$ ], while lipid peroxidation increased in the hypothalamus of male pups of early-weaned groups in comparison to female pups (Fig. 4B).

### **3.4. Early weaning altered the activity of antioxidant enzymes in the hippocampus and hypothalamus of pups**

We measured the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx, and GLO1 in the hippocampus and hypothalamus of 21 days-old female and male pups. We observed no effect of early weaning [ $F(1, 60) = 1.735$ ;  $p = 0.169$ ] or sex [ $F(1, 60) = 0.137$ ;  $p = 0.712$ ] on the activity of SOD in the hippocampus (Fig. 5A). However, there was a significant interaction between the factors, early weaning vs sex [ $F(1, 60) = 3.129$ ;  $p = 0.032$ ] in the hippocampus; while SOD activity increased in female pups of early weaning groups compared to control, the SOD activity in male of early weaning groups remained similar to control values. In the hypothalamus (Fig. 5B), there was no effect of early weaning [ $F(3, 60) = 0.485$ ;  $p = 0.693$ ] and no interaction

between the factors [ $F(3, 60) = 0.025$ ;  $p = 0.994$ ], however, the activity of SOD was higher in male pups compared to female, indicating an effect of sex [ $F(1, 60) = 15.61$ ;  $p = 0.0002$ ].

Measuring the activity of CAT, was not observed any significant effect of early weaning in the hippocampus or hypothalamus [ $F(3, 61) = 2.263$ ;  $p = 0.090$  and  $F(3, 60) = 0.156$ ;  $p = 0.925$ , respectively], as well as neither effect on sex [ $F(1, 61) = 2.255$ ;  $p = 0.138$  and  $F(1, 60) = 0.285$ ;  $p = 0.595$ , respectively] (Fig. 5C and D). In addition, no interaction was observed in the hippocampus [ $F(3, 61) = 1.098$ ;  $p = 0.357$ ] or in the hypothalamus [ $F(3, 60) = 2.268$ ;  $p = 0.090$ ].

Regarding GPx activity in the pups' hippocampus (Fig. 5E) we observed no effect of early weaning [ $F(1, 61) = 1.960$ ;  $p = 0.129$ ] or sex [ $F(1, 61) = 0.893$ ;  $p = 0.348$ ]. However, there was a significant interaction between the factors, early weaning vs sex [ $F(1, 61) = 3.313$ ;  $p = 0.026$ ]; while GPx activity increased in female pups of early weaning groups compared to control, the GPx activity in male of early weaning groups remained similar to control values. In the hypothalamus (Fig. 5F), the activity of GPx was not altered by early weaning [ $F(3, 59) = 1.333$ ;  $p = 0.272$ ] and no interaction was observed [ $F(3, 59) = 1.108$ ;  $p = 0.353$ ]. However, GPx activity increased in female pups compared to male pups [ $F(3, 59) = 23.82$ ;  $p < 0.0001$ ].

Regarding hippocampal GLO1 activity (Fig. 5G) we observed that early weaning increased significantly GLO1 activity in all female pups weaned early compared to control group [ $F(3, 59) = 3.178$ ;  $p = 0.030$ ]. We also observed that GLO1 activity increased in the hippocampus of male pups compared to female pups [ $F(1, 59) = 6.676$ ;  $p = 0.012$ ], but no interaction between factors was observed [ $F(3, 59) = 2.431$ ;  $p = 0.074$ ]. In the hypothalamus (Fig. 5H), we observed an increased activity of GLO1 in female pups compared to male pups [ $F(1, 61) = 26.60$ ;  $p < 0.0001$ ], but no effect of early weaning [ $F(3, 61) = 2.254$ ;  $p = 0.091$ ] and no interaction between factors [ $F(3, 61) = 0.467$ ;  $p = 0.706$ ].

### **3.5. The ratio of the activities of SOD/GPx + CAT are altered in the hippocampus and hypothalamus of pups**

The imbalance in the ratio of SOD, GPx and CAT results in the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which may generate noxious hydroxyl radicals; therefore, we calculated the ratio of the activity of antioxidant enzymes SOD/GPx + CAT in the hippocampus and hypothalamus of 21-days-old female and male pups. In the hippocampus (Fig. 6A), we observed no effect of sex the SOD/GPx + CAT ratio [F (1, 56) = 3.597; p = 0.063], but early weaning increased SOD/GPx + CAT ratio in female pups of EWCF and EWWC in comparison to female pups of control group [F (3, 56) = 3.277; p = 0.027]. In addition, we observed an interaction between the factors early weaning vs sex in the hippocampus [F (3, 56) = 4.521; p = 0.006], in which the SOD/GPx + CAT ratio of females of early weaning groups was higher than male pups.

In the hypothalamus (Fig. 6B), we observed an increased SOD/GPx + CAT ratio in female pups group in comparison to male pups groups [F (1, 56) = 15.18; p = 0.0003]. However, observed no effect of early weaning [F (3, 56) = 1.105; p = 0.355] and no interaction between factors in the SOD/GPx + CAT ratio in the hypothalamus [F (3, 56) = 2.102; p = 0.110].

### **3.6. Early weaning altered anxiety-like behavior and memory parameters in male pups**

We assessed object recognition memory, spatial learning and memory, exploratory and anxiety-like behavior in 60-days old female and male pups. In the training phase of the object recognition task, we observed that female and male pups explore the two objects equally (data not shown), as expected. In the test phase (Fig. 7A), we observed that female of all groups [F (1, 59) = 59.10; p < 0.0001] and males of control, EWCF and EWWC groups [F (1, 49) = 45.68; p < 0.0001] spent more time exploring the novel compared to familiar object. Conversely, the time spent exploring the novel compared to familiar object was not different in male pups from EWB group (Tukey post-hoc analyze, p > 0.05). Regarding the object discrimination index

(Fig. 7B), we observed a decrease in male pups from EWB group compared to male pups of control [F (3, 108) = 4.623; p = 0.004] but no effect of sex [F (1, 108) = 0.357; p = 0.552] and no interaction [F (3, 108) = 0.127; p = 0.944].

In the Y-maze task (Fig. 8), we observed that early weaning did not alter spontaneous alternation [F (3, 101) = 0.968; p = 0.411] or interaction between factors [F (3, 101) = 1.475; p = 0.226]. However, we observed a decreased in female pups group compared to male pups regarding spontaneous alternation [F (1, 101) = 5.644; p = 0.019].

In the elevated plus-maze task (Fig. 9), we observed a decrease on the time in open arms [F (3, 108) = 3.017; p = 0.033] (Fig. 9A) and an increased on the closed arms [F (3, 108) = 3.221; p = 0.025] (Fig. 9B) in male pups from EWWC groups compared to male pups from EWCF group. We observed no effect of sex on the time in open [F (1, 108) = 3.668; p = 0.058] and closed [F (1, 108) = 3.059; p = 0.083] arms, and no interaction between early weaning and sex [F (3, 108) = 1.462; p = 0.229 and F (3, 108) = 1.427; p = 0.239, respectively]. Regarding the number of entries in the open, we observed that male pups from EWB group entered less in the arms in comparison to male pups from control and EWFC group [F (3, 108) = 6.400; p = 0.0005] (Fig. 9C). Already in the closed arms (Fig. 9D), we observed that male pups from EWB group entered less in the arms in comparison to male pups from EWWC group [F (3, 108) = 5.337; p = 0.002]. In addition, we observed that female pups group entered more often in the closed arms than male pups group, demonstrating an effect of sex [F (1, 108) = 5.730; p = 0.018] but showed no effect in the number of entries in the open arms [F (1, 108) = 2.513; p = 0.116]. No interaction between factors, early weaning vs sex, was observed for the number of entries in the open arms [F (3, 108) = 1.434; p = 0.237] and closed arms [F (3, 108) = 1.287; p = 0.283]. Regarding the distance traveled in the arms of elevated plus-maze (Fig. 9E and F), in female pups was higher than male pups in the open and closed arms [F (1, 108) = 8.926; p = 0.003 and F (1, 108) =

4.003;  $p = 0.048$ ]. Lastly, early weaning did not alter distance traveled between groups in the open [ $F(3, 108) = 0.8491$ ;  $p = 0.470$ ] and closed [ $F(3, 108) = 2.442$ ;  $p = 0.068$ ] arms .

#### **4. Discussion**

It is known that during the lactation period breastfeeding is important not only for the nourishment of the offspring but also for the development of endocrine, neural, immune, psychological systems, and sensorial, executive and behavioral functions (Agosti *et al.*, 2017; Ballard *et al.*, 2013; Esteban-Cornejo *et al.*, 2017; Koletzko, 2005). However, less than 40% of children globally are exclusively breastfed during the first 6 months of life (WHO, 2015). In this context, animal models have provided knowledge concerning cellular and molecular alteration resulting from early weaning (Ahola *et al.*, 2017; Kikusui *et al.*, 2016; Mogi *et al.*, 2016; Peixoto *et al.*, 2019; Pohl *et al.*, 2017; Takita *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), although there is a lack in the literature concerning biochemical modulation in the offspring's brain. Therefore, in the present study we used Wistar rats in an attempt to unveil possible biochemical changes in the brain of 21-days-old pups after early weaning, as well as behavioral alteration at young adulthood.

Comparative studies of equivalent age in humans and rats indicate that 21 days of a rat's life are equivalent to 6 months of age in humans (Quinn, 2005). In this study, pups were weaned on postnatal day 16 that is equivalent to 4 months of age in humans (Quinn, 2005). It is known that rat pups of 13 days of life are able to eat alone plaut (Plaut *et al.*, 1972), and at age of 14 days rat pups initiate solid food intake (Hahn *et al.*, 2013), initiating self-feeding as early as postnatal day 16 (Thiels *et al.*, 1990).

We observed that pups' body weight and weight gain reduced significantly in the five days after early weaning in the groups of pups lacking biological maternal care. One day following early weaning, the pups lacking biological maternal care lose weight, which stabilized on the second day and gradually increased from third to fifth days after weaning despite being lower than



control pups. Although we did not observe statistically significant reduction in the body weight of pups from bromocriptine group, the mean of body weight of female and male pups was about 8% lower than control pups, and the weight gain was 10% lower in females and 12,6% in males. In accordance with our findings, S. N. Lima *et al.* (2011) demonstrated reduction of about 10% in the body weight of early-weaned rat pups compared to control weaning using pharmacological approach on PND21. Pietrobon *et al.* (2019) compared non-pharmacological approach and pharmacological approaches of early weaning and demonstrated significant reduction in the body weight of female and male pups on PND21 for both groups compared to control weaning. The interruption of breastfeeding by exclusive intake of solid foods might contribute to lower body weight observed on the first days of weaning. Moreover, according to our findings it seems that beyond the nutritional challenge, physical interaction of mother-pups in late lactation period exerts influence on body weight of female and male pups. Maternal-infant interaction is influenced by both quantity and quality of tactile stimuli during breastfeeding contribute to the development of the child's nervous system (Del Bono *et al.*, 2012; Krol *et al.*, 2018).

Considering puberty and young adults male pups, only body weight from early weaning groups lacking biological maternal care were lower than control male. Boueri *et al.* (2015) also observed lower body weight in early-weaned male rat pups without care on PND60. On PND60 pharmacological early weaning did not alter body weight and weight gain of pups, however we observed a tendency of gradual increase in the body weight and weight gain. These findings are in accordance with others studies, which observed no difference or lower body weight at puberty (dos Santos Oliveira *et al.*, 2011; Pietrobon *et al.*, 2019), but increased weight at adulthood after inhibition of lactation with bromocriptine (de Moura *et al.*, 2009; S. N. Lima *et al.*, 2011). It might be occurring a “catch-up” effect in the pups from pharmacological early weaning group that is still not evident on PND60.

There is a dietary transition process in normal weaning in which occur nutritional changes, a shift from fat-rich diet (breast milk) to a carbohydrate-rich diet (chow) (Azara *et al.*, 2008). Lipids are the main metabolic fuel during breastfeeding due its importance for the central nervous system (CNS) development (Gonzalez *et al.*, 2016). Thus, the abrupt replacement of breast milk by exclusive intake of carbohydrates-rich solid foods and the absence of mothers represent a metabolic and psychological challenges that might affect the cell metabolism. Threat, we investigated redox state and mitochondrial parameters in 21 days old hippocampus and hypothalamus of female and male rat pups exposed to the early weaning models.

We found no changes in mitochondrial mass and membrane potential or in mitochondrial-specific superoxide levels in the hippocampus or hypothalamus of 21 days-old pups (data not showed). To date there is a lack of studies investigating mitochondrial parameters in early-weaned offspring; however, other models of nutritional or early-life stress challenges showed mitochondrial alterations in the brain of adult rats (Ferreira *et al.*, 2015; Filipovic *et al.*, 2011; Toniazzo *et al.*, 2019).

Under normal conditions, the metabolism generates reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS), and a well functioning antioxidant system is able to deal with it before occurring oxidative damage (Barry Halliwell *et al.*, 2015). We found an interaction between early weaning by maternal separation and sex concerning DCFH oxidation in the hypothalamus, indicating that early weaning induces an increase in the levels of overall reactive species in females and a reduction in males. We found increased nitric oxide levels (NO) in the hippocampus of pharmacologically early-weaned male pups. The main source of NO in the hippocampus is the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (Zhou *et al.*, 2007), whose expression is positively regulated by glucocorticoids (GC), hormone under control of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and released in stress (Zhou *et al.*, 2011). de Moura *et al.* (2009) showed that pharmacological

early weaning increased plasma levels of GC in adult male rats, but in non-pharmacological early weaning GC levels remained unchanged (N. S. Lima *et al.*, 2013). This could explain the change observed in males from EWB group.

Early-weaned male pups presented high levels of lipid peroxidation in the hypothalamus compared to control males. Lipid peroxidation occurs when cell membrane lipids are damaged by reactive species (Gaschler *et al.*, 2017; Ramana *et al.*, 2014). CNS myelin is enriched by constitutive lipids (Cermenati *et al.*, 2015; Hussain *et al.*, 2019), making the brain highly susceptible to reactive species. We found no damage to lipids in the hippocampus and hypothalamus of early-weaned female pups, however the levels of lipid peroxidation in the hippocampus of female pups are higher than male. Studies have shown that the brain of male pups subjected to maternal separation early in life present an imbalance of redox state and increased lipid peroxidation (Almeida *et al.*, 2018; Daniels *et al.*, 2012; Uysal *et al.*, 2005). Taking together, these findings suggest that male offspring are more susceptible than female, but we cannot rule out that other biomolecules can be damaged by reactive species.

We observed an interaction between early weaning and sex on hippocampal activity of SOD and GPx antioxidant enzymes, indicating the activity of SOD and GPx are increased by early weaning in female pups and reduced in male pups. In the hypothalamus, SOD activity in female pups was lower than male, and the opposite was observed in GPx activity. Some authors suggest that the analysis of the SOD/GPX + CAT ratio is more relevant than the absolute activity of individual enzymes once they work together in biological environments, so disturbances in the enzymatic ratio would suggest an accumulation of hydrogen peroxide (de Haan *et al.*, 1995; Kostka *et al.*, 1998; Kozakiewicz *et al.*, 2019). We observed increased SOD/GPx + CAT ratio in the hippocampus of early-weaned female, but not male, pups lacking biological maternal

care. These data suggest that lack of maternal care may result in increased peroxide levels in the hippocampus of female pups.

The GLO1 catalyzes the toxic by-product of the glycolytic pathway methylglyoxal (MGO) that is responsible for the formation of advanced glycation end products (AGEs) which contribute to cytotoxicity and cellular inflammation (Inagi, 2016; Thornalley, 2005). We found increased GLO1 activity in the hippocampus of early-weaned females. Increased GLO1 indicates elimination of MGO, that might be altered in the present study due to the shift of breastfeeding to a diet rich in carbohydrates. Lockwood *et al.* (1970) demonstrated that rats early weaning on PND15 induces an increase in the enzymatic profile involved with lipogenesis at 20 days of age due to dietary changes.

Breastfeeding and maternal care also influences social- and mood- related behavior in the offspring (Agosti *et al.*, 2017; Krol *et al.*, 2018). Animal studies have demonstrated increased aggressive, anxious-like and depressive-like behavior (Ishikawa *et al.*, 2015; Kanari *et al.*, 2005; Kodama *et al.*, 2008), and reduced cognitive performance (Poletto *et al.*, 2006) after early weaning. Assessing the behavioral performance in 60-days-old early-weaned rats, we observed an increased anxiety-like behavior in early-weaned male offspring from bromocriptine demonstrated by a reduced number of entries in the open arms in the elevated plus maze test. In addition, pharmacological weaning induced also a deficit in the long-term recognition memory in male offspring. Bromocriptine inhibits prolactin release, which plays an anxiolytic role through controlling GC levels (Brown *et al.*, 2017; Torner *et al.*, 2002) and influences maternal behavior at postpartum period (Bridges, 2015), and variation in care affects pups' development (Kikusui *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1997). It is possible that maternal stress caused by bromocriptine administration acts as an anxiogenic factor in the offspring.

The behavioral changes observed only in male pups that were weaned pharmacologically suggest that sex hormones are involved. Owen *et al.* (2003) demonstrated that during development in rodents, changes in the corticosteroid receptor present sexual differences that are related to sex-specific changes in the HPA behavior at adulthood. Surprisingly, we demonstrate that rats weaned earlier by bromocriptine showed alterations in NO levels at 21 days of life, which has a fundamental role in the GC receptors expression (Lopez-Figueroa *et al.*, 1998; L. J. Zhu *et al.*, 2014), demonstrating that possibly the increased levels of NO in the hippocampus at this period allied to the sex-induced changes in the expression of GC during development could explain the behavioral alterations presented at 60 days of age only in male pups.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the main findings of the present work are the sex-dependent differences in redox homeostasis in the hippocampus and hypothalamus of 21-days-old pups submitted to different approaches of early weaning. In addition, we observed that early weaning reduced the body weight and weight gain of female and male pups along the first 60 postnatal days. We also showed the behavioral performance of early-weaned young adult male offspring on PND60 in learning and memory tasks and anxiety-like behavior.

Despite our data rising the importance of maternal care and milk supply in the initial phase of life, additional studies are needed to uncover the molecular mechanisms underlying the neurochemical changes induced by different types of early weaning and how this can reflect on the behavior of the offspring in the face of a negative stimuli later in life.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **Acknowledgements**

This study was supported by the Pró-Reitoria de Pesquisa/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Universal 442406/2014-2 and INCT 465671/2014-4). The authors thank Central Animal House of Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil for all the attention to animals used in this study.

## References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, *105*, 121-126. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3
- Agorastos, A., Pervanidou, P., Chrousos, G. P., & Kolaitis, G. (2018). Early life stress and trauma: developmental neuroendocrine aspects of prolonged stress system dysregulation. *Hormones (Athens)*, *17*(4), 507-520. doi: 10.1007/s42000-018-0065-x
- Agosti, M., Tandoi, F., Morlacchi, L., & Bossi, A. (2017). Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. *Pediatr Med Chir*, *39*(2), 157. doi: 10.4081/pmc.2017.157
- Ahola, M. K., Vapalahti, K., & Lohi, H. (2017). Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. *Sci Rep*, *7*(1), 10412. doi: 10.1038/s41598-017-11173-5
- Allen, J., Romay-Tallon, R., Brymer, K. J., Caruncho, H. J., & Kalynchuk, L. E. (2018). Mitochondria and Mood: Mitochondrial Dysfunction as a Key Player in the Manifestation of Depression. *Front Neurosci*, *12*, 386. doi: 10.3389/fnins.2018.00386
- Almeida, P. M. D., Kamath, S. U., Shenoy, P. R., Bernhardt, L. K., Kishore, A., & Rai, K. S. (2018). Persistent attenuation of brain oxidative stress through aging in perinatal maternal separated rat pups supplemented with choline and docosahexaenoic acid or *Clitoria ternatea* aqueous root extract. *Folia Neuropathol*, *56*(3), 206-214. doi: 10.5114/fn.2018.78702
- August, P. M., Maurmann, R. M., Saccomori, A. B., Scortegagna, M. C., Flores, E. B., Klein, C. P., . . . Matte, C. (2018). Effect of maternal antioxidant supplementation and/or exercise practice during pregnancy on postnatal overnutrition induced by litter size reduction: Brain redox homeostasis at weaning. *Int J Dev Neurosci*, *71*, 146-155. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.09.003
- Azara, C. R., Maia, I. C., Rangel, C. N., Silva-Neto, M. A., Serpa, R. F., De Jesus, E. F., . . . Fialho, E. (2008). Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups. *Biological research*, *41*(3), 317-330.
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*, *60*(1), 49-74. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.002
- Barreiros, A., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, *29*(1), 113.
- Bass, R., & Eneli, I. (2015). Severe childhood obesity: an under-recognised and growing health problem. *Postgrad Med J*, *91*(1081), 639-645. doi: 10.1136/postgradmedj-2014-133033
- Baxter, P. S., & Hardingham, G. E. (2016). Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med*, *100*, 147-152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.027
- Boueri, B. F. C., Pessanha, C. R., da Costa, L. R., Ferreira, M. R., Melo, H. S., de Abreu, M. D. C., . . . Boaventura, G. T. (2015). Body composition in male rats subjected to early weaning and treated with diet containing flour or flaxseed oil after 21 days until 60 days. *J Dev Orig Health Dis*, *6*(6), 553-557. doi: 10.1017/S2040174415007163
- Bridges, R. S. (2015). Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocrinol*, *36*, 178-196. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.11.007
- Brown, R. S. E., Aoki, M., Ladyman, S. R., Phillipps, H. R., Wyatt, A., Boehm, U., & Grattan, D. R. (2017). Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(40), 10779-10784. doi: 10.1073/pnas.1708025114
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(8), 1193-1205. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.04.017

- Cermenati, G., Mitro, N., Audano, M., Melcangi, R. C., Crestani, M., De Fabiani, E., & Caruso, D. (2015). Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology. *Biochim Biophys Acta*, *1851*(1), 51-60. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.08.011
- Chaban, Y., Boekema, E. J., & Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim Biophys Acta*, *1837*(4), 418-426. doi: 10.1016/j.bbabiio.2013.10.004
- Choksi, K. B., Boylston, W. H., Rabek, J. P., Widger, W. R., & Papaconstantinou, J. (2004). Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochim Biophys Acta*, *1688*(2), 95-101. doi: 10.1016/j.bbadiis.2003.11.007
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W. J., Miller, G. E., Frank, E., Rabin, B. S., & Turner, R. B. (2012). Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(16), 5995-5999. doi: 10.1073/pnas.1118355109
- Crispel, Y., Shaoul, R., Khamaise, R., Sabo, E., & Hochberg, Z. (2019). Effect of weaning age on the small intestine mucosa of rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, *44*(9), 985-989. doi: 10.1139/apnm-2018-0454
- Daniels, W. M., Marais, L., Stein, D. J., & Russell, V. A. (2012). Exercise normalizes altered expression of proteins in the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation. *Exp Physiol*, *97*(2), 239-247. doi: 10.1113/expphysiol.2011.061176
- de Haan, J. B., Cristiano, F., Iannello, R. C., & Kola, I. (1995). Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int*, *35*(6), 1281-1297.
- de Kloet, E. R., Joels, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, *6*(6), 463-475. doi: 10.1038/nrn1683
- de Moura, E. G., Bonomo, I. T., Nogueira-Neto, J. F., de Oliveira, E., Trevenzoli, I. H., Reis, A. M., . . . Lisboa, P. C. (2009). Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol*, *587*(Pt 20), 4919-4929. doi: 10.1113/jphysiol.2009.176289
- Del Bono, E., & Rabe, B. (2012). Breastfeeding and child cognitive outcomes: Evidence from a hospital-based breastfeeding support policy: ISER Working Paper Series.
- dos Santos Oliveira, L., de Lima, D. P., da Silva, A. A., da Silva, M. C., de Souza, S. L., & Manhaes-de-Castro, R. (2011). Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. *Behav Processes*, *86*(1), 75-80. doi: 10.1016/j.beproc.2010.09.005
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, *31*(1), 47-59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x
- Esteban-Cornejo, I., Henriksson, P., Cadenas-Sanchez, C., Vanhelst, J., Forsner, M., Gottrand, F., . . . group, H. s. (2017). Early life programming of attention capacity in adolescents: The HELENA study. *Matern Child Nutr*. doi: 10.1111/mcn.12451
- Ferreira, C. F., Bernardi, J. R., da Silva, D. C., de Sa Couto-Pereira, N., de Souza Mota, C., Krolow, R., . . . Dalmaz, C. (2015). Mitochondrial and Oxidative Stress Aspects in Hippocampus of Rats Submitted to Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency After Exposure to Early Stress. *Neurochem Res*, *40*(9), 1870-1881. doi: 10.1007/s11064-015-1679-x
- Filipovic, D., Zlatkovic, J., Inta, D., Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., & Gass, P. (2011). Chronic isolation stress predisposes the frontal cortex but not the hippocampus to the potentially detrimental release of cytochrome c from mitochondria and the activation of caspase-3. *J Neurosci Res*, *89*(9), 1461-1470. doi: 10.1002/jnr.22687



- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 482(3), 419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086
- Gonzalez, H. F., & Visentin, S. (2016). Nutrients and neurodevelopment: lipids. *Arch Argent Pediatr*, 114(5), 472-476. doi: 10.5546/aap.2016.eng.472
- 10.5546/aap.2016.472
- Hahn, P., Koldovský, O., & Kerkut, G. A. (2013). *Utilization of Nutrients During Postnatal Development: International Series of Monographs in Pure and Applied Biology: Zoology*: Elsevier Science.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18(9), 685-716. doi: 10.2165/00002512-200118090-00004
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (U. Oxford University Press Ed. Fourth Edition ed. Vol. Ed 4 ).
- Hanson, M., Fall, C., Robinson, S., & Baird, J. (2009). Early life nutrition and lifelong health.
- Hock, M. B., & Kralli, A. (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol*, 71, 177-203. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163119
- Holmstrom, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(6), 411-421. doi: 10.1038/nrm3801
- Holzerova, E., & Prokisch, H. (2015). Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *Int J Biochem Cell Biol*, 63, 16-20. doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.021
- Hussain, G., Wang, J., Rasul, A., Anwar, H., Imran, A., Qasim, M., . . . Sun, T. (2019). Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis*, 18(1), 26. doi: 10.1186/s12944-019-0965-z
- Inagi, R. (2016). RAGE and glyoxalase in kidney disease. *Glycoconj J*, 33(4), 619-626. doi: 10.1007/s10719-016-9689-8
- Ishikawa, J., & Ishikawa, A. (2013). The effects of voluntary running exercise coincidence with social isolation after early weaning on monoaminergic axonal development. *Neuroscience*, 230, 31-38. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.020
- Ishikawa, J., Nishimura, R., & Ishikawa, A. (2015). Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. *Eur J Neurosci*, 41(4), 442-453. doi: 10.1111/ejn.12825
- Ishikawa, J., Ogawa, Y., Owada, Y., & Ishikawa, A. (2014). Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. *Behav Brain Res*, 264, 197-206. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.007
- Iwata, E., Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2007). Fostering and environmental enrichment ameliorate anxious behavior induced by early weaning in Balb/c mice. *Physiol Behav*, 91(2-3), 318-324. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.013
- Joels, M. (2018). Corticosteroids and the brain. *J Endocrinol*, 238(3), R121-R130. doi: 10.1530/JOE-18-0226
- Kanari, K., Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2005). Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. *Behav Brain Res*, 156(1), 45-52. doi: 10.1016/j.bbr.2004.05.008

- Kikusui, T., Ichikawa, S., & Mori, Y. (2009). Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(5), 762-772. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.12.009
- Kikusui, T., Ishio, Y., Nagasawa, M., Mogil, J. S., & Mogi, K. (2016). Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. *Dev Psychobiol*, *58*(8), 1101-1107. doi: 10.1002/dev.21443
- Kikusui, T., Kanbara, N., Ozaki, M., Hirayama, N., Ida, K., Tokita, M., . . . Mogi, K. (2019). Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex. *Sci Rep*, *9*(1), 3991. doi: 10.1038/s41598-019-40530-9
- Kikusui, T., Nakamura, K., Kakuma, Y., & Mori, Y. (2006). Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behav Brain Res*, *175*(1), 96-103. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.007
- Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2004). Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. *Physiol Behav*, *81*(1), 37-42. doi: 10.1016/j.physbeh.2003.12.016
- Kim, J. A., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*, *102*(4), 401-414. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165472
- Klein, C. P., Dos Santos Rodrigues, K., Hozer, R. M., de Sa Couto-Pereira, N., Saccomori, A. B., Dal Magro, B. M., . . . Matte, C. (2018). Swimming exercise before and during pregnancy: Promising preventive approach to impact offspring s health. *Int J Dev Neurosci*, *71*, 83-93. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.08.009
- Klein, C. P., Hoppe, J. B., Saccomori, A. B., Dos Santos, B. G., Sagini, J. P., Crestani, M. S., . . . Matte, C. (2019). Physical Exercise During Pregnancy Prevents Cognitive Impairment Induced by Amyloid-beta in Adult Offspring Rats. *Mol Neurobiol*, *56*(3), 2022-2038. doi: 10.1007/s12035-018-1210-x
- Kodama, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2008). Effects of early weaning on anxiety and prefrontal cortical and hippocampal myelination in male and female Wistar rats. *Dev Psychobiol*, *50*(4), 332-342. doi: 10.1002/dev.20289
- Koletzko, B. (2005). Early nutrition and its later consequences: new opportunities. *Adv Exp Med Biol*, *569*, 1-12.
- Kostka, T., Drai, J., Berthouze, S. E., Lacour, J. R., & Bonnefoy, M. (1998). Physical activity, fitness and integrated antioxidant system in healthy active elderly women. *Int J Sports Med*, *19*(7), 462-467. doi: 10.1055/s-2007-971945
- Kozakiewicz, M., Rowinski, R., Kornatowski, M., Dabrowski, A., Kedziora-Kornatowska, K., & Strachecka, A. (2019). Relation of Moderate Physical Activity to Blood Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in the Elderly. *Oxid Med Cell Longev*, *2019*, 5123628. doi: 10.1155/2019/5123628
- Krol, K. M., & Grossmann, T. (2018). Psychological effects of breastfeeding on children and mothers. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, *61*(8), 977-985. doi: 10.1007/s00103-018-2769-0
- Kuhlman, K. R., Chiang, J. J., Horn, S., & Bower, J. E. (2017). Developmental psychoneuroendocrine and psychoneuroimmune pathways from childhood adversity to disease. *Neurosci Biobehav Rev*, *80*, 166-184. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.05.020
- Langley-Evans, S. C. (2015). Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet*, *28 Suppl 1*, 1-14. doi: 10.1111/jhn.12212
- Lima, N. S., Moura, E. G., Franco, J. G., Pinheiro, C. R., Pazos-Moura, C. C., Cabanelas, A., . . . Lisboa, P. C. (2013). Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res*, *45*(1), 22-30. doi: 10.1055/s-0032-1323703
- Lima, S. N., de Moura, E. G., Passos, M. C., Nogueira Neto, F. J., Reis, A. M., de Oliveira, E., & Lisboa, P. C. (2011). Early weaning causes undernutrition for a short period and

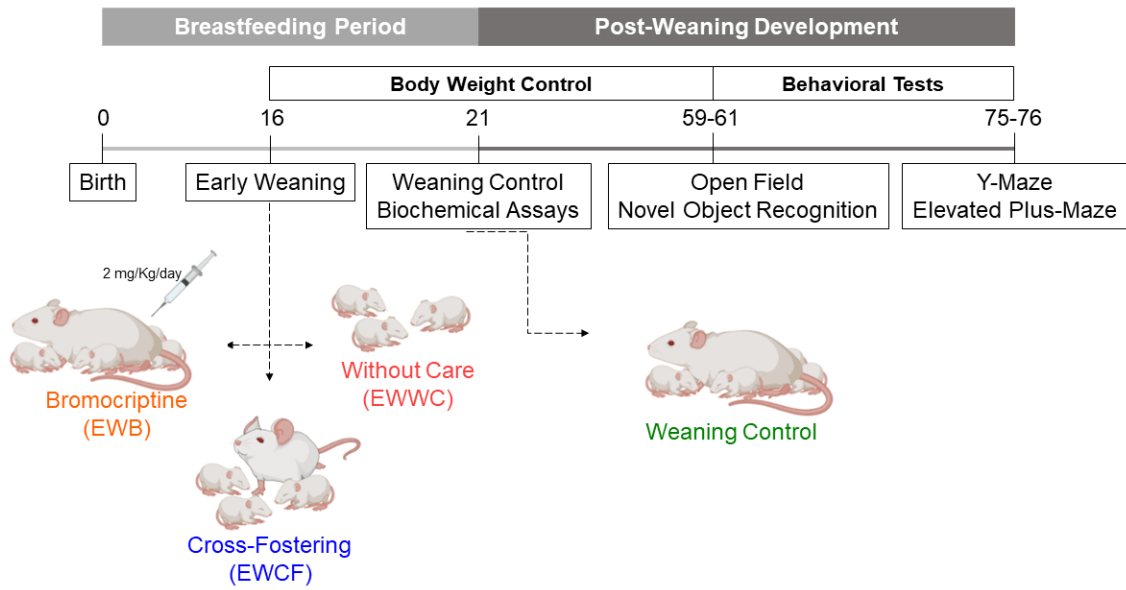
- programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr*, 105(9), 1405-1413. doi: 10.1017/S0007114510005064
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., . . . Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332), 1659-1662. doi: 10.1126/science.277.5332.1659
- Lockwood, E. A., Bailey, E., & Taylor, C. B. (1970). Factors involved in changes in hepatic lipogenesis during development of the rat. *Biochem J*, 118(1), 155-162. doi: 10.1042/bj1180155
- Lopez-Figueroa, M. O., Itoi, K., & Watson, S. J. (1998). Regulation of nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat hippocampus by glucocorticoids. *Neuroscience*, 87(2), 439-446. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00075-x
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10(6), 434-445. doi: 10.1038/nrn2639
- Maurice, T., Hiramatsu, M., Itoh, J., Kameyama, T., Hasegawa, T., & Nabeshima, T. (1994). Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res*, 647(1), 44-56. doi: 10.1016/0006-8993(94)91397-8
- McLellan, A. C., & Thornalley, P. J. (1989). Glyoxalase activity in human red blood cells fractioned by age. *Mech Ageing Dev*, 48(1), 63-71. doi: 10.1016/0047-6374(89)90026-2
- Millar, I. D., & Shennan, D. B. (1999). The regulation of Na(+)-dependent anionic amino acid transport by the rat mammary gland. *Biochim Biophys Acta*, 1421(2), 340-346. doi: 10.1016/s0005-2736(99)00140-6
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247(10), 3170-3175.
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci*, 22(1), 11-19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Mogi, K., Ishida, Y., Nagasawa, M., & Kikusui, T. (2016). Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol*, 58(8), 1034-1042. doi: 10.1002/dev.21437
- Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M., & Dehpour, A. R. (2018). Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*, 105, 1205-1222. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.086
- Murphy, M. P. (2006). Induction of mitochondrial ROS production by electrophilic lipids: a new pathway of redox signaling? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(5), H1754-1755. doi: 10.1152/ajpheart.00040.2006
- Nakamura, K., Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2008). Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. *Behav Brain Res*, 187(2), 442-448. doi: 10.1016/j.bbr.2007.10.002
- Netto, C. A., Dias, R. D., & Izquierdo, I. (1986). Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. *Psychoneuroendocrinology*, 11(4), 437-446. doi: 10.1016/0306-4530(86)90005-3

- Owen, D., & Matthews, S. G. (2003). Glucocorticoids and sex-dependent development of brain glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*, *144*(7), 2775-2784. doi: 10.1210/en.2002-0145
- Pearson-Smith, J. N., & Patel, M. (2017). Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *Int J Mol Sci*, *18*(11). doi: 10.3390/ijms18112365
- Peixoto, T. C., Pietrobon, C. B., Bertasso, I. M., Caraméz, F. A. H., Calvino, C., Santos, T. R., . . . Lisboa, P. C. (2019). Early weaning alters the thermogenic capacity of brown adipose tissue in adult male and female rats. *Eur J Nutr*. doi: 10.1007/s00394-019-02071-9
- Pervanidou, P., & Chrousos, G. P. (2018). Early-Life Stress: From Neuroendocrine Mechanisms to Stress-Related Disorders. *Horm Res Paediatr*, *89*(5), 372-379. doi: 10.1159/000488468
- Pi, J., Zhang, Q., Fu, J., Woods, C. G., Hou, Y., Corkey, B. E., . . . Andersen, M. E. (2010). ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *244*(1), 77-83. doi: https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.05.025
- Pietrobon, C. B., Miranda, R. A., Bertasso, I. M., Mathias, P. C. F., Bonfleur, M. L., Balbo, S. L., . . . de Moura, E. G. (2019). Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in wistar rats of both sexes. *J Physiol*. doi: 10.1113/JP278833
- Plaut, S. M., & Davis, J. M. (1972). Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels. *Physiol Behav*, *8*(1), 43-51. doi: 10.1016/0031-9384(72)90128-x
- Pohl, C. S., Medland, J. E., Mackey, E., Edwards, L. L., Bagley, K. D., DeWilde, M. P., . . . Moeser, A. J. (2017). Early weaning stress induces chronic functional diarrhea, intestinal barrier defects, and increased mast cell activity in a porcine model of early life adversity. *Neurogastroenterol Motil*, *29*(11). doi: 10.1111/nmo.13118
- Poletto, R., Steibel, J. P., Siegford, J. M., & Zanella, A. J. (2006). Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets. *Brain Res*, *1067*(1), 36-42. doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.001
- Quinn, R. (2005). Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*, *21*(6), 775-777. doi: 10.1016/j.nut.2005.04.002
- Rajasekaran, A., Venkatasubramanian, G., Berk, M., & Debnath, M. (2015). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. *Neurosci Biobehav Rev*, *48*, 10-21. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.11.005
- Ramana, K. V., Srivastava, S., & Singhal, S. S. (2014). Lipid peroxidation products in human health and disease 2014. *Oxid Med Cell Longev*, *2014*, 162414. doi: 10.1155/2014/162414
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, *33*, 8-13. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.010
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(11), 1603-1616. doi: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
- Rodrigues, V. S. T., Moura, E. G., Bernardino, D. N., Carvalho, J. C., Soares, P. N., Peixoto, T. C., . . . Lisboa, P. C. (2018). Supplementation of suckling rats with cow's milk induces hyperphagia and higher visceral adiposity in females at adulthood, but not in males. *J Nutr Biochem*, *55*, 89-103. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.12.001
- Rollins, N. C., Bhandari, N., Hajeebhoy, N., Horton, S., Lutter, C. K., Martines, J. C., . . . Lancet Breastfeeding Series, G. (2016). Why invest, and what it will take to improve

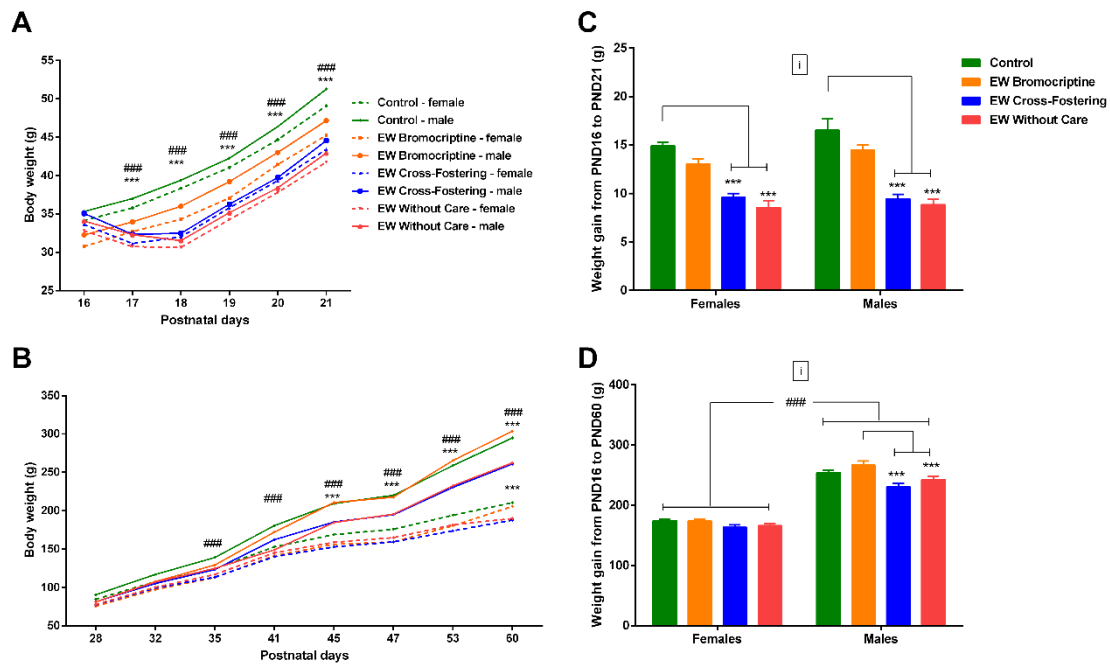
- breastfeeding practices? *Lancet*, 387(10017), 491-504. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01044-2
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24(10), R453-462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Stone, V., Maciel August, P., Scortegagna Crestani, M., Brum Saccomori, A., Dal Magro, B. M., Moura Maurmann, R., . . . Matte, C. (2019). Adaptive effects of gestational caloric restriction in the mitochondria of Wistar rats' brain: A DOHaD approach. *Int J Dev Neurosci*, 79, 1-10. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.09.004
- Takita, M., & Kikusui, T. (2016). Early weaning influences short-term synaptic plasticity in the medial prefrontal-anterior basolateral amygdala pathway. *Neurosci Res*, 103, 48-53. doi: 10.1016/j.neures.2015.08.003
- Thiels, E., Alberts, J. R., & Cramer, C. P. (1990). Weaning in rats: II. Pup behavior patterns. *Dev Psychobiol*, 23(6), 495-510. doi: 10.1002/dev.420230605
- Thornalley, P. J. (2005). Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci*, 1043, 111-117. doi: 10.1196/annals.1333.014
- Toniazzo, A. P., Arcego, D. M., Lazzaretti, C., Mota, C., Schnorr, C. E., Pettenuzzo, L. F., . . . Dalmaz, C. (2019). Sex-dependent effect on mitochondrial and oxidative stress parameters in the hypothalamus induced by prepubertal stress and access to high fat diet. *Neurochem Int*, 124, 114-122. doi: 10.1016/j.neuint.2019.01.008
- Torner, L., Toschi, N., Nava, G., Clapp, C., & Neumann, I. D. (2002). Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci*, 15(8), 1381-1389. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.01965.x
- Uysal, N., Gonenc, S., Acikgoz, O., Pekcetin, C., Kayatekin, B. M., Sonmez, A., & Semin, I. (2005). Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. *Neurosci Lett*, 384(1-2), 98-101. doi: 10.1016/j.neulet.2005.04.052
- Victoria, C. G., Bahl, R., Barros, A. J., Franca, G. V., Horton, S., Krasevec, J., . . . Lancet Breastfeeding Series, G. (2016). Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet*, 387(10017), 475-490. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01024-7
- Wang, Q. J., Cui, Y. Z., Zhang, X. Y., & Su, J. (2017). Effect of early weaning on the expression of excitatory amino acid transporter 1 in the jejunum and ileum of piglets. *Mol Med Rep*, 16(5), 6518-6525. doi: 10.3892/mmr.2017.7421
- Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 77, 325-333. doi: 10.1016/s0076-6879(81)77046-0
- WHO. (2015, Acesso em 15 de Fevereiro de 2020). 10 facts on breastfeeding. from <https://www.who.int/features/factfiles/breastfeeding/en/>
- Yu, C. H., Chen, C. Y., & Chang, C. C. (2019). The immediate effects of weaning stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal alteration of newly weaned piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 103(4), 1218-1223. doi: 10.1111/jpn.13104
- Zhou, Q. G., Hu, Y., Hua, Y., Hu, M., Luo, C. X., Han, X., . . . Zhu, D. Y. (2007). Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem*, 103(5), 1843-1854. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04914.x
- Zhou, Q. G., Zhu, L. J., Chen, C., Wu, H. Y., Luo, C. X., Chang, L., & Zhu, D. Y. (2011). Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. *J Neurosci*, 31(21), 7579-7590. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0004-11.2011

- Zhu, L. H., Zhao, K. L., Chen, X. L., & Xu, J. X. (2012). Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J Anim Sci*, *90*(8), 2581-2589. doi: 10.2527/jas.2012-4444
- Zhu, L. J., Liu, M. Y., Li, H., Liu, X., Chen, C., Han, Z., . . . Zhou, Q. G. (2014). The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *PLoS One*, *9*(5), e97689. doi: 10.1371/journal.pone.0097689
- Zou, J., & Crews, F. (2006). CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol*, *26*(4-6), 385-405. doi: 10.1007/s10571-006-9045-9

## Figure captions

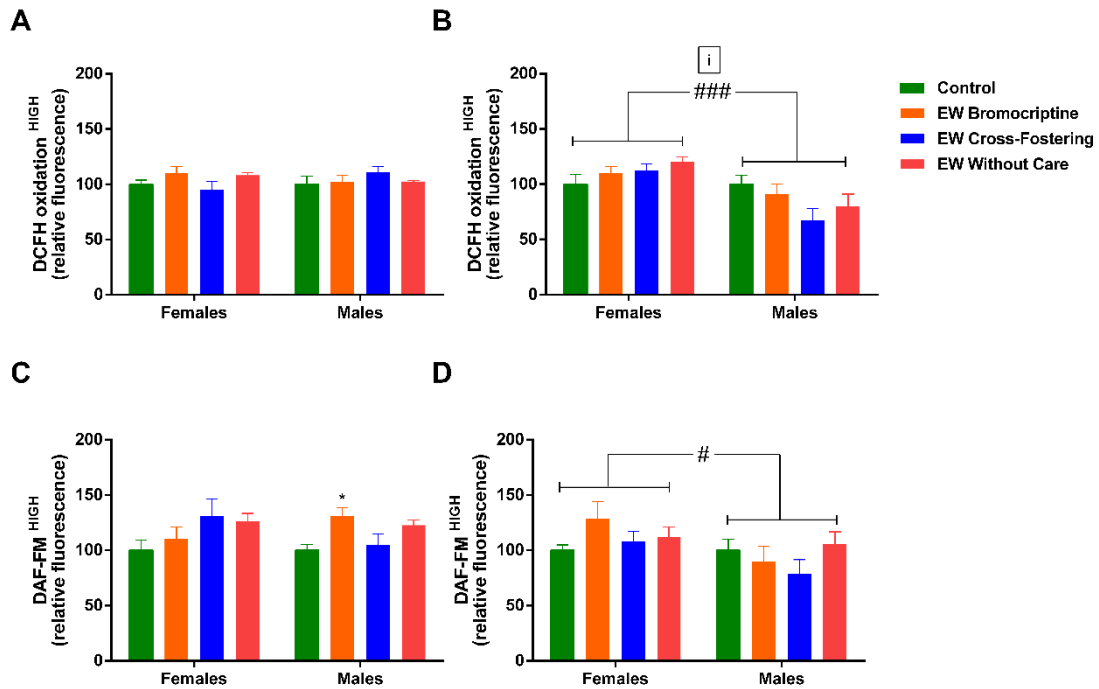


**Figure 1.** Experimental design.

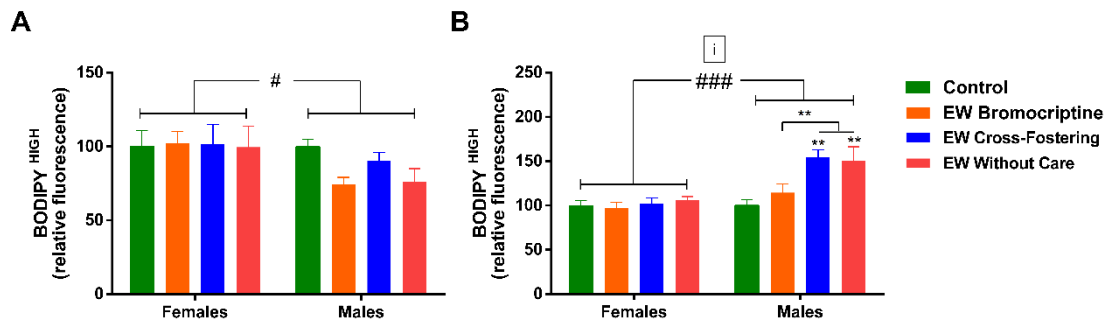


**Figure 2.** Body weight parameters in early weaned female and male offspring. Daily weight from PND16 to PND21 (A), daily weight from PND28 to PND60 (B), weight gain on PND21 (C), and weight gain on PND60 (D). Pups' body weight data were analyzed through two-way ANOVA repeated measures ( $n = 8-27$ ) and pups' weight gain were analyzed through two-way ANOVA ( $n = 13-27$ ). \*\*\*  $p < 0.0001$  indicating effect of weaning type and ###  $p < 0.0001$  indicating effect of sex. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are presented as mean + SEM. PND, postnatal days.

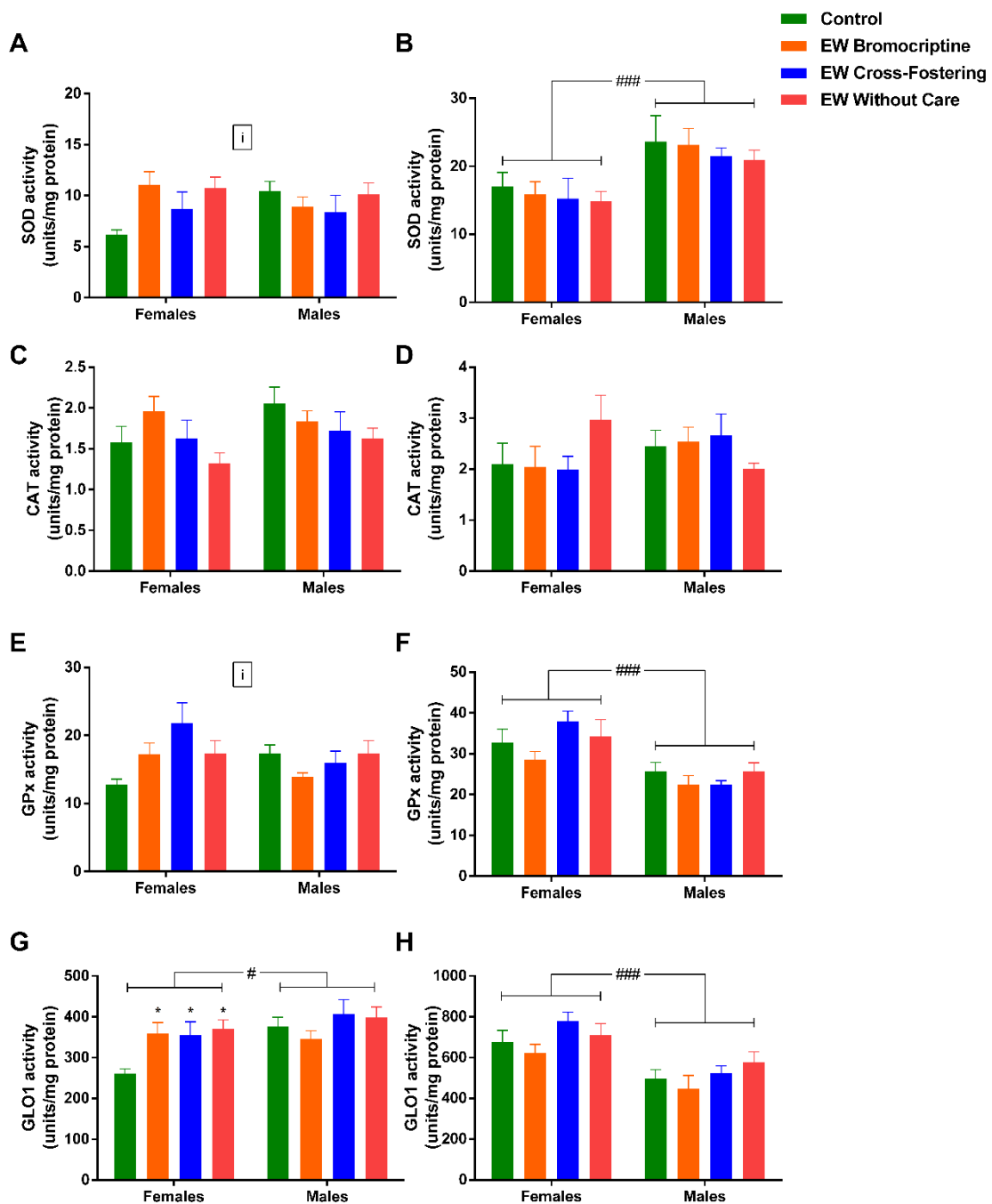




**Figure 3.** Effect of early weaning on reactive species levels in the hippocampus (A-C) and hypothalamus (B-D) of 21-days-old pups. DCFH oxidation (A and B) and nitric oxide levels (C and D). Two-way ANOVA showed an effect of sex on DCFH oxidation in the hypothalamus; an interaction between weaning type and sex on DCFH oxidation in the hypothalamus; an effect of weaning type on nitric oxide levels in the hippocampus and an effect of sex on nitric oxide levels in the hypothalamus. \*  $p < 0.05$  indicating effect of weaning type; #  $p < 0.05$  and ###  $p < 0.0001$  indicating effect of sex; and letter “i” indicating interaction. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are expressed as mean + SEM (n = 6–9/group).

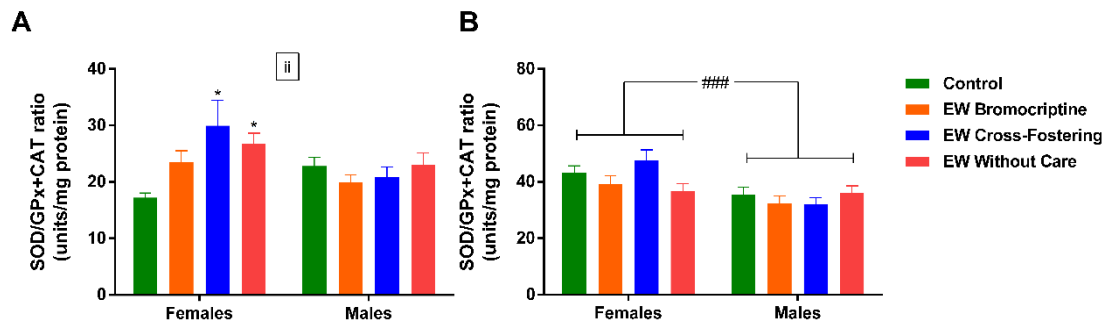


**Figure 4.** Effect of early weaning on lipid peroxidation in the hippocampus (A) and hypothalamus (B) of 21-days-old pups. Two-way ANOVA showed an effect of sex in the hippocampus and hypothalamus; an effect of weaning type in the hypothalamus; and an interaction between weaning type and sex in the hypothalamus; \*\*  $p < 0.01$  indicating effect of weaning type; #  $p < 0.05$  and ###  $p < 0.0001$  indicating effect of sex; and letter “i” indicating interaction. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are expressed as mean + SEM ( $n = 6-9$ /group).

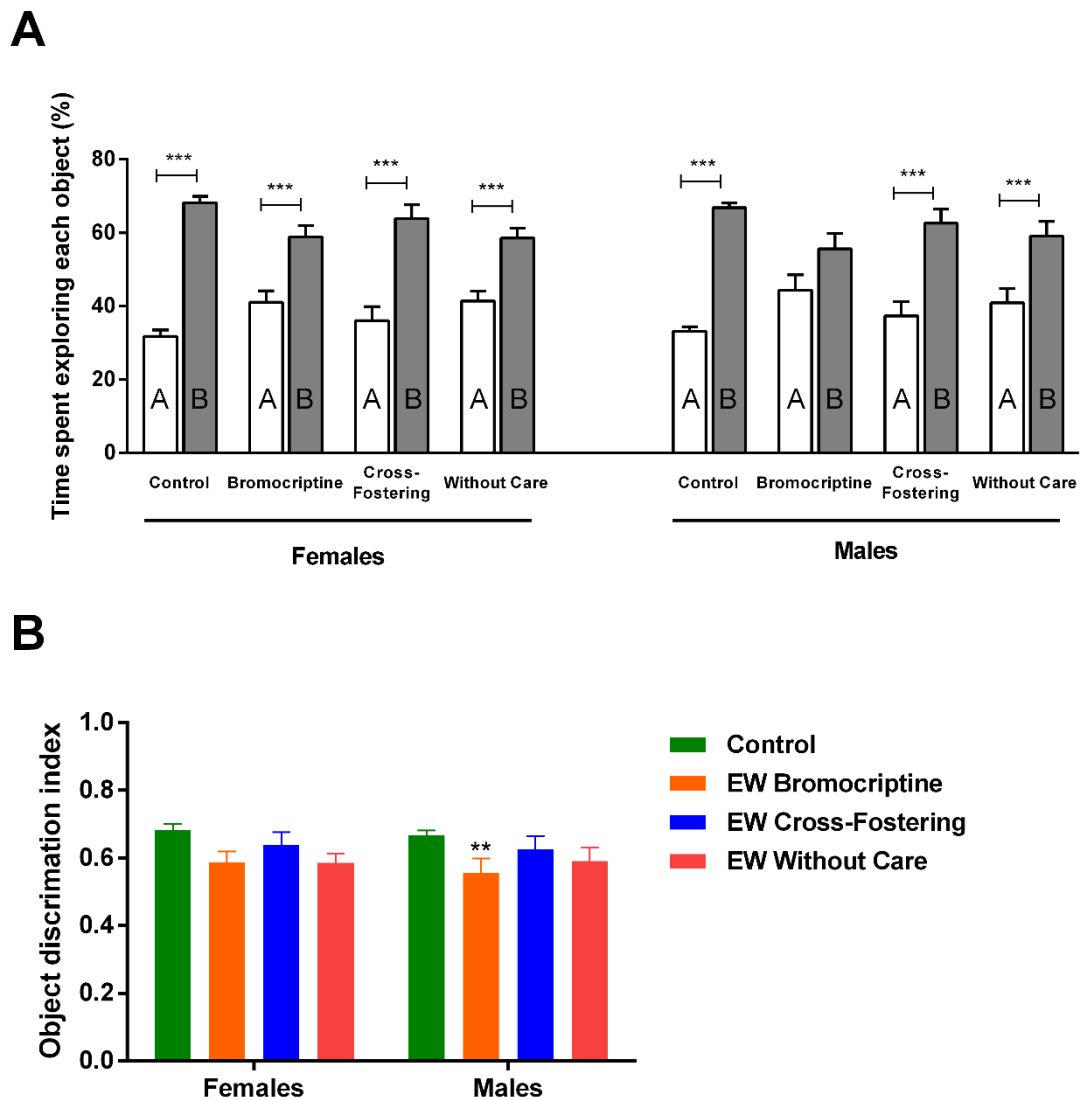


**Figure 5.** Effect of early weaning on the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glyoxalase (GLO) in the hippocampus (A-D) and hypothalamus (E-F) of 21 days-old pups. Two-way ANOVA showed an effect of sex on SOD, GPx and GLO activities in the hypothalamus; an interaction between weaning type and sex on SOD and GPx in the hippocampus; and an effect of weaning type and sex on GLO activity in the hippocampus. \*  $p < 0.05$  indicating effect of weaning type; #  $p < 0.05$  and

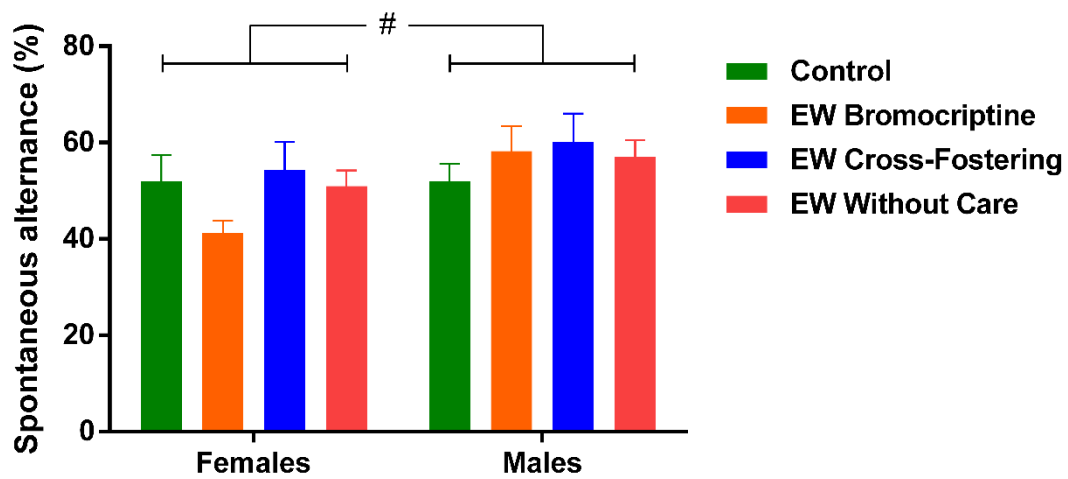
###  $p < 0.0001$  indicating effect of sex; and letter “i” indicating interaction. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are expressed as mean + SEM (n = 7-9/group).



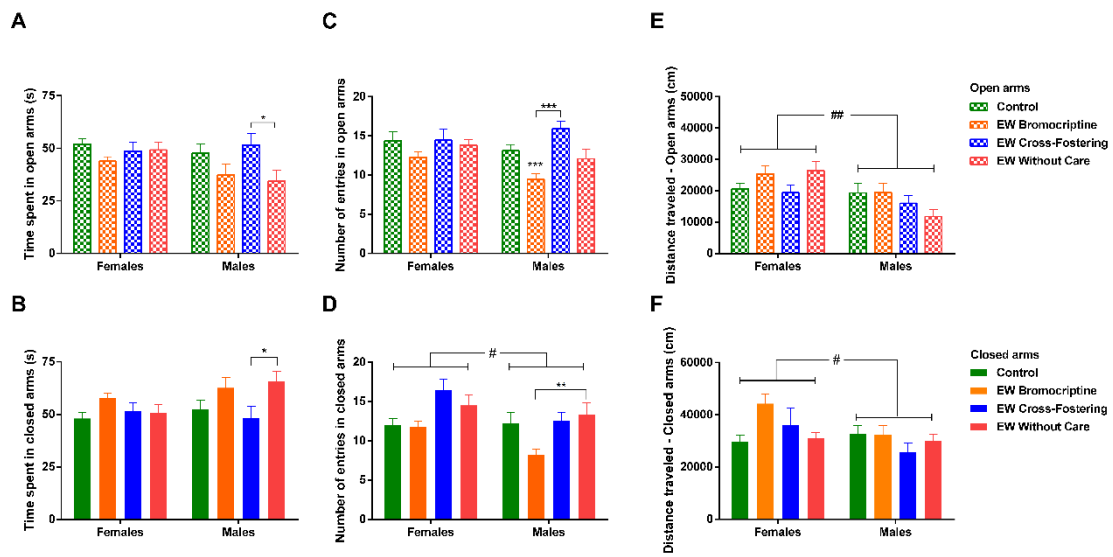
**Figure 6.** Effects of early weaning on the ratio of superoxide dismutase/glutathione peroxidase plus catalase (SOD/GPx + CAT) in the hippocampus (A) and hypothalamus (B) of 21 days-old pups. Two-way ANOVA showed an effect of sex on SOD/GPx + CAT ratios in the hypothalamus; an interaction between weaning type and sex on SOD/GPx + CAT ratio in the hippocampus; and an effect of weaning type SOD/GPx+CAT ratio in the hippocampus. \*  $p < 0.05$  indicating effect of weaning type; ###  $p < 0.0001$  indicating effect of sex; and letter “ii” indicating interaction. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are expressed as mean + SEM ( $n = 6-9$ /group).



**Figure 7.** Behavioral performance of 60 days-old pups in the object recognition test. Time spent exploring the objects A and B (A) and object recognition index (B). Two-way ANOVA showed an effect of weaning type on object recognition index and an effect time exploring the objects. \*\*  $p < 0.01$  indicating effect of weaning type; \*\*\*  $p < 0.0001$  indicating effect of time exploring the objects. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are expressed as mean + SEM ( $n = 10-23$ /group).



**Figure 8.** Spontaneous alternation performed by 60 days-old pups in the Y-maze test. Two-way ANOVA showed an effect of sex on spontaneous alternation. #  $p < 0.05$  indicating effect of sex. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are expressed as mean + SEM (n = 10-23/group).



**Figure 9.** Behavioral performance of 60 days-old pups in the elevated plus-maze. Time in open and closed arms (A and B), number of entries in the open and closed arms (C and D), and distance traveled in the open and closed arms (E and F). Two-way ANOVA showed an effect of weaning type on time in open and closed arms, and number of entries in the open and closed arms; and an effect of sex on number of entries in the closed arms and distance traveled in the open and closed arms. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.0001$  indicating effect of weaning type; #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  indicating effect of sex. Differences between groups are indicated in the graphs according Tukey post-hoc analyses. Data are expressed as mean + SEM ( $n = 10-23/\text{group}$ ).



## **Supplementary Material**

### **1. Biochemical assays**

#### **1.1. Flow cytometry**

Mitochondrial superoxide was measured using 1  $\mu$ M MitoSOX® Red (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR - USA) (Marcelino *et al.*, 2013), the reactive species levels were measured using 10  $\mu$ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A count of 30,000 events was acquired per sample in a BD FACSCalibur Flow Cytometry System (San Jose, CA, USA). Data were analyzed using the software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### **2. Behavioral tests**

#### **2.2. Open field test**

The open field test was used to evaluate the exploratory and locomotor behavior. Rats were evaluated individually and their behavior was recorded for 5 min. The apparatus consisted of a wood box divided equally into 12 quadrants (60 cm length x 60 cm width x 60 cm deep). The total distance traveled, the number of crossed lines and the time spent in the center and periphery of the apparatus were measured (Netto *et al.*, 1986).

### **3. Results**

#### **3.1. Effects of early weaning on mitochondrial parameters in the hippocampus and hypothalamus of female and male pups**

We measured the number of functional mitochondria (Mitotracker Green and Red double-positive events indicating mitochondrial mass and membrane potential) in the hippocampus and the hypothalamus of 21 days-old female and male pups. In the hippocampus (Suppl. Fig. 1A), neither early weaning nor sex altered mitochondrial mass and membrane potential [ $F(3, 45) = 0.063$ ;  $p = 0.980$  and  $F(1, 45) = 3.459$ ;  $p = 0.069$ , respectively], and no interaction be-

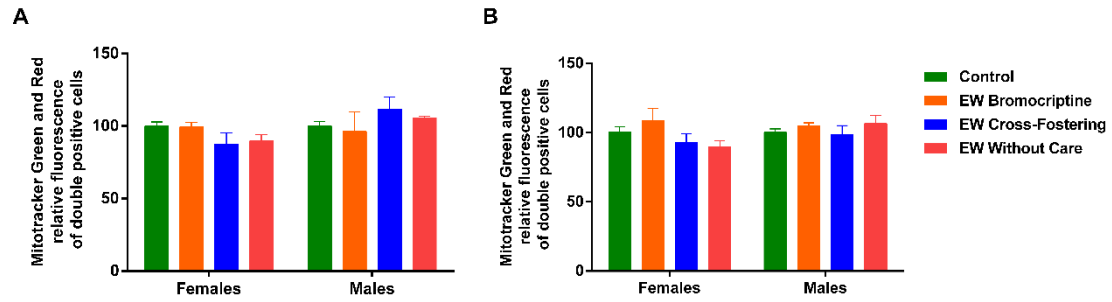
tween factors, early weaning *vs* sex, was observed [ $F(3, 45) = 1.805$ ;  $p = 0.160$ ]. In the hypothalamus (Suppl. Fig. 1B), neither early weaning nor sex altered mitochondrial mass and membrane potential [ $F(3, 49) = 1.474$ ;  $p = 0.233$  and  $F(1, 49) = 1.215$ ;  $p = 0.276$ , respectively], and no interaction between factors, early weaning *vs* sex, was observed [ $F(3, 49) = 1.200$ ;  $p = 0.319$ ].

Regarding the levels of mitochondrial superoxide, neither early weaning nor sex altered this parameter in the hippocampus [ $F(3, 52) = 0.796$ ;  $p = 0.502$  and  $F(1, 52) = 1.640$ ;  $p = 0.206$ , respectively] (Suppl. Fig. 2A) and hypothalamus [ $F(3, 49) = 0.122$ ;  $p = 0.947$  and  $F(1, 49) = 0.726$ ;  $p = 0.398$ , respectively] (Suppl. Fig. 2B). In addition, no interaction was observed in the hippocampus [ $F(3, 52) = 0.896$ ;  $p = 0.449$ ] or hypothalamus [ $F(3, 49) = 0.170$ ;  $p = 0.916$ ].

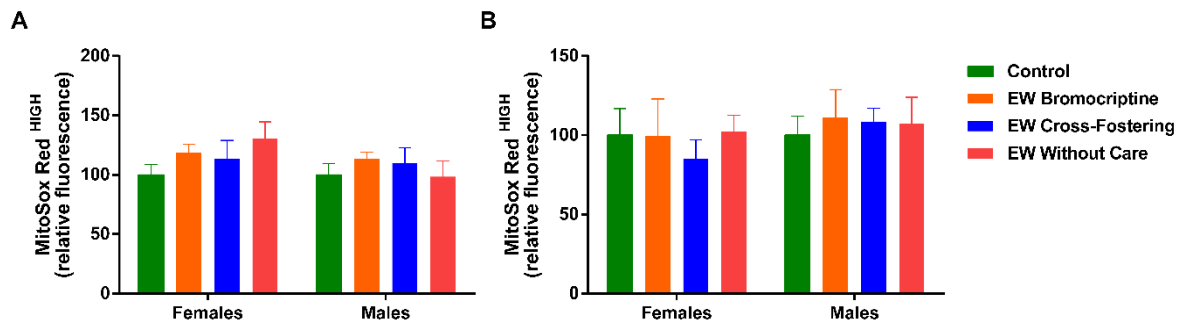
### **3.2. Effects of early weaning in the exploratory parameters in pups**

Early weaning did not alter female and male pups' locomotor parameters in the open field test (Suppl. Fig. 3). Regarding distance travel, neither early weaning nor sex was altered this parameter [ $F(3, 104) = 2.516$ ;  $p = 0.062$  and  $F(1, 104) < 0.001$ ;  $p = 0.988$ , respectively], and we observed no interaction between factors, early weaning *vs* sex [ $F(3, 104) = 1.295$ ;  $p = 0.280$ ] (Suppl. Fig. 3A). Regarding the crossings number, neither early weaning [ $F(3, 105) = 1.581$ ;  $p = 0.198$ ] nor sex [ $F(1, 105) = 2.445$ ;  $p = 0.1209$ ] altered this parameter in test, also was observed no interaction between factors [ $F(3, 105) = 0.539$ ;  $p = 0.657$ ] (Suppl. Fig. 3B). We observed no effect of sex in the periphery [ $F(1, 101) = 0.167$ ;  $p = 0.684$ ] and center [ $F(1, 102) = 0.359$ ;  $p = 0.555$ ] time, neither effect of early weaning [ $F(1, 101) = 0.167$ ;  $p = 0.6839$  and  $F(3, 102) = 0.069$ ;  $p = 0.976$ , respectively]. Equally, we observed no interaction between early weaning and sex in the periphery and center time [ $F(3, 101) = 0.265$ ;  $p = 0.850$  and  $F(3, 102) = 0.204$ ;  $p = 0.893$ , respectively] (Suppl. Fig. 3C).

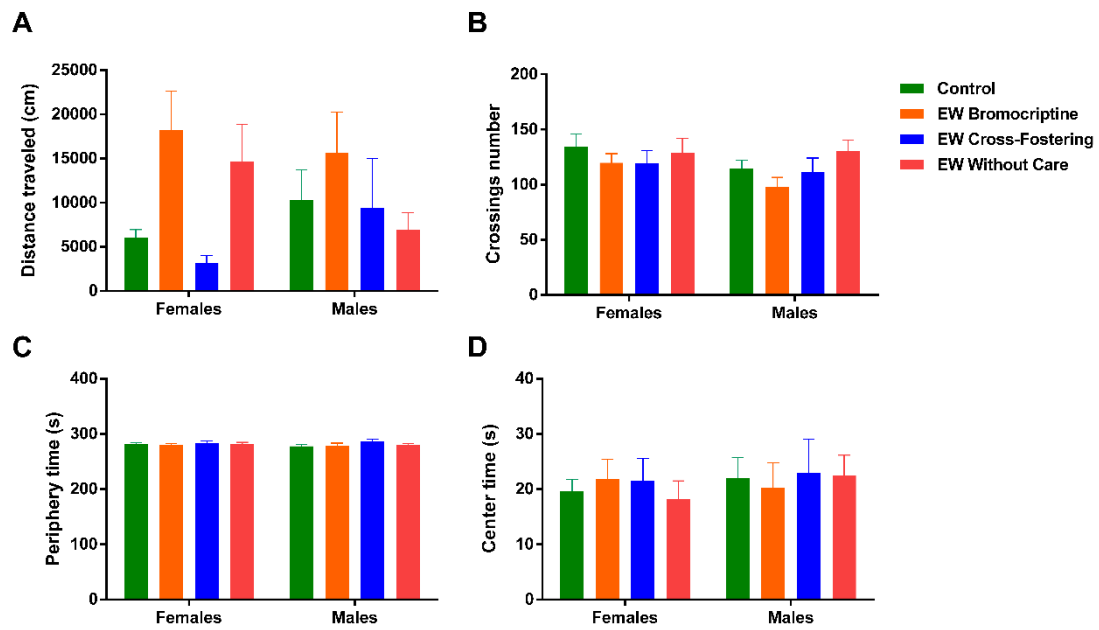
## Supplementary Figures



**Figure 1.** Effect of early weaning on mitochondrial function in the hippocampus (A) and hypothalamus (B) of 21 days-old pups. Two-way ANOVA showed no effect of weaning type and sex, and no interaction on mitochondrial function in the hippocampus and hypothalamus ( $p > 0.05$ ). Data are expressed as mean + SEM ( $n = 6-9$ /group).



**Figure 2.** Effect of early weaning on mitochondrial superoxide levels in the hippocampus (A) and hypothalamus (B) of 21 days-old pups. Two-way ANOVA showed no effect of weaning type and sex, and no interaction on mitochondrial function in the hippocampus and hypothalamus ( $p > 0.05$ ). Data are expressed as mean + SEM ( $n = 6-9$ /group).



**Figure 3.** Behavioral performance of 60-days-old pups in the open field test. Distance travel (A), crossings number (B), and periphery, and center time (C and D). Two-way ANOVA indicated no effect of weaning type and sex, and no interaction ( $p > 0.05$ ). Data are expressed as mean + SEM ( $n = 10-20/\text{group}$ ).

## References

- Marcelino, T. B., Longoni, A., Kudo, K. Y., Stone, V., Rech, A., de Assis, A. M., . . . Matte, C. (2013). Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*, *246*, 28-39. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.043
- Netto, C. A., Dias, R. D., & Izquierdo, I. (1986). Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. *Psychoneuroendocrinology*, *11*(4), 437-446. doi: 10.1016/0306-4530(86)90005-3

#### 4. Discussão

No presente estudo, foi demonstrado que diferentes tipos de desmame precoce aos 16 dias pós-natal promove alterações no estado redox nas estruturas encefálicas avaliadas, hipocampo e hipotálamo, em filhotes fêmeas e machos, avaliados aos 21 dias de vida. Além disso, o modelo de desmame precoce promoveu alterações no desempenho comportamental nos filhotes aos 60 dias de vida.

O aleitamento materno é essencial para o desenvolvimento na primeira infância. Através do fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, o leite materno é essencial na formação estrutural e diferenciação neuronal, além de auxiliar na sinaptogênese durante a maturação cerebral (FERNSTROM, 1999; PETRYK; WEILER, 2002). Além disso, a quantidade e qualidade dos estímulos táteis durante a amamentação, parece contribuir no desenvolvimento do sistema nervoso das crianças, principalmente através do comportamento materno que é influenciado por hormônios liberados durante a sucção infantil (DEL BONO; RABE, 2012). Assim a interação mãe-bebê parece contribuir para o desenvolvimento do comportamento dos recém-nascidos (AGOSTI *et al.*, 2017; CAMERON *et al.*, 2005). Desse modo, a amamentação materna tem sido considerada a alimentação “padrão ouro” na vida pós-natal (GARTNER *et al.*, 2005).

Considerando os benefícios que o desmame promove às crianças, a OMS vem fortemente sugerindo que durante os primeiros seis meses os recém-nascidos sejam alimentados exclusivamente por leite materno e, que a partir dessa idade haja a introdução de alimentos sólidos como forma de complementação ao aleitamento (WHO, 2009). No entanto, a taxa de lactentes que são submetidos à alimentação preconizada pela OMS compreendendo apenas 40% dos lactentes até o sexto mês (WHO, 2015). A crescente taxa de prevalência do desmame realizado precocemente tem se tornado um problema de saúde pública, uma vez que estudos têm evidenciado que o desmame precoce pode alterar o desenvolvimento do organismo e provocar

distúrbios metabólicos e comportamentais na prole (DOS SANTOS OLIVEIRA *et al.*, 2011; KANARI *et al.*, 2005; KIKUSUI *et al.*, 2019; KIKUSUI *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2019; PIETROBON *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2020).

Devido à alta prevalência de desmame precoce, se faz necessário estudos que tenham como objetivo investigar as possíveis consequências a curto e longo prazo à saúde do indivíduo exposto à esta prática. Entretanto, torna-se difícil a produção de estudos em humanos principalmente devido ao longo tempo e ao alto custo da pesquisa clínica. Além disso, a observação das consequências bioquímicas do desmame precoce sobre encéfalo humano a curto prazo torna-se inviável. Portanto o uso de animais tem sido de grande ajuda para compreensão das possíveis consequências do desmame realizado precocemente. Quando comparado as idades entre ratos e humanos, sabe-se que 21 dias de vida em um rato são equivalentes à 6 meses em um ser humano (QUINN, 2005), idade preconizada pela OMS para o um desmame adequado. PLAUT e DAVIS (1972) relatam que os filhotes de ratos aos 13 dias de vida já são capazes de comer, manter a temperatura corporal e evacuar sozinhos, e aos 14 dias iniciam a ingestão de alimentos sólidos (HAHN *et al.*, 2013). No entanto, uma observação intensiva do padrão comportamental de ratos no período do 14° até o 35° dia de vida demonstrou que os filhotes iniciam a alimentação sozinhos no 16° dia pós-natal (THIELS *et al.*, 1990). Considerando os estudos anteriores, decidimos avaliar os efeitos do desmame precoce no 16° dia pós-natal, o que representaria o desmame aos 4 meses de idade em humanos (QUINN, 2005) e possibilitaria que os animais pudessem se desenvolver adequadamente sem prejuízos severos à saúde.

Três tipos diferentes de desmame precoce foram investigados para compreender as possíveis consequências no encéfalo e no comportamento dos animais. O primeiro foi o desmame realizado farmacologicamente, com o intuito de observar possíveis alterações devido apenas à falta de leite materno, utilizamos o medicamento Parlodel (Norvatis ®), composto por bromocriptina. A Bromocriptina cessa a produção de leite através da inibição da síntese de prolactina



(BERNARD *et al.*, 2015). O segundo modelo de desmame precoce foi realizado por separação materna seguida por adoção por ratas fêmeas virgens. O intuito deste grupo foi entender como a falta de leite materno vinculado à falta de cuidado materno biológico poderia afetar o desenvolvimento da prole. IWATA *et al.* (2007) relataram que mães adotivas exerciam algum tipo de cuidado com a prole, porém não com a mesma intensidade e qualidade das mães biológicas. O último modelo de desmame precoce foi realizado apenas por separação materna. Os animais foram separados de suas mães biológicas e alocados em uma caixa moradia sozinhos para compreender as consequências da falta do leite materno vinculado à falta de cuidados maternos.

O peso corporal dos animais do 16º dia até o 59º dia de vida foi avaliado. Os grupos de filhotes desmamados por separação materna, submetidos à adoção ou os filhotes sem cuidado, aos 16 dias de idade apresentaram uma redução no peso corporal comparado com os filhotes desmamados aos 21 dias de vida, no entanto rapidamente começaram a ganhar peso novamente. Embora os filhotes apresentem algum tipo de independência nutricional após o 14º dia de vida, neste período os filhotes ainda precisam da mãe e da ninhada para manter a termorregulação. Na ausência das mães, os animais precisam ajustar a temperatura corporal através de respostas metabólicas, processo que demanda aumento no consumo de energia (GERRISH *et al.*, 1998). No grupo bromocriptina, embora não tenhamos observado uma redução estatisticamente significativa no peso corporal dos filhotes, a média de peso corporal desses animais foi cerca de 8% menor que nos filhotes controle. Nossos achados estão de acordo com LIMA *et al.* (2011), que demonstrou uma redução de cerca de 10% no peso corporal de filhotes de ratos desmamados por bromocriptina, em comparação com o grupo controle aos 21 dias de idade. Alterações nutricionais ocorrem durante o desmame, visto que o leite materno é rico em gordura (69,8%) e pobre em carboidratos (6,8%) (AZARA *et al.*, 2008), enquanto a dieta comercial Nuvilab CR-1, utilizada em nossos experimentos, é rica em carboidratos (55%) e pobre em gordura (4,5%). Assim a privação abrupta de leite materno e a exposição a alimentos exclusivamente sólidos

com composição nutricional diferente do leite pode promover a redução da ingestão calórica, que contribui para um menor peso corporal no primeiro dia de desmame. Possivelmente a troca de alimentação pode ter provocado uma breve alteração nutricional, promovendo uma necessidade adaptativa dos animais para a nova dieta, refletindo no peso corporal e influenciado significativamente pela ausência materna biológica.

Estudos demonstram que o desmame precoce é capaz de promover alterações no metabolismo dos animais adultos. O desmame realizado farmacologicamente induziu em ratos machos a obesidade, hiperleptinemia, resistência à insulina, dislipidemia, hipotireoidismo central e aumentou os níveis de hormônios adrenais (BONOMO *et al.*, 2007; DE MOURA *et al.*, 2009). Além disso, LIMA *et al.* relataram que o desmame não-farmacológico além de promover igualmente obesidade, resistência à insulina e hiperleptinemia, também promoveu hipertrigliceridemia (LIMA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2011). PEIXOTO *et al.* (2019) demonstraram que o desmame precoce, farmacológico e não-farmacológico, alteraram a capacidade termogênica do tecido adiposo marrom, que contribui parcialmente para a obesidade na idade adulta. Em nosso estudo, durante o período da fase adulta, os pesos corporais dos animais desmamados farmacologicamente não apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle, porém este período de avaliação pode ter sido prematuro para observar aumento significativo no ganho de peso. Além disso, os filhotes machos submetidos ao desmame por separação materna, tanto o grupo exposto à adoção quanto os filhotes que não foram submetidos a qualquer tipo de cuidado, permaneceram com o peso corporal menor do que os filhotes machos desmamados na idade preconizada. Nossos dados corroboram com BOUERI *et al.* (2015), onde foi observado que os filhotes machos desmamados precocemente por separação materna aos 14 dias de vida apresentaram uma menor massa corporal aos 60 dias de vida.

O período de 21 a 60 dias de vida é caracterizado como uma fase de recuperação, durante este período os ratos podem passar por adaptações fisiológicas retornando à sua trajetória de

crescimento geneticamente programada após um período de retardo do crescimento promovido por desnutrição, efeito conhecido como “*catch-up effect*” (BIESWAL *et al.*, 2006). O efeito *catch-up* é dependente da quantidade de ingestão de alimentos e da eficiência da utilização da energia (DA COSTA *et al.*, 2008; SORIGUER *et al.*, 2003). Nós observamos este efeito nas fêmeas dos grupos que foram submetidos a separação materna, com ou sem adoção, apesar delas apresentarem um peso menor do que as fêmeas controles aos 21 dias, aos 60 dias exibiram pesos identificados ao grupo controle. Já em machos, este efeito parece estar sendo iniciado no grupo bromocriptina, pois podemos observar uma tendência de aumento gradual no peso corporal destes animais.

O processo de desenvolvimento estrutural e funcional do SNC ocorre principalmente no último trimestre da gravidez até aproximadamente 2 anos dos indivíduos (BELFORT *et al.*, 2008). O desenvolvimento pós-natal do SNC envolve o acúmulo dos ácidos graxos provenientes exclusivamente do leite materno, nos quais são importantes para o crescimento e a maturação do cérebro (GONZALEZ; VISENTIN, 2016; INNIS, 2014). No entanto, durante a transição alimentar no desmame, a substituição abrupta do leite materno pela ingestão exclusiva de alimentos ricos em carboidratos e a ausência de mães representam desafios metabólicos e psicológicos que podem afetar o metabolismo celular. Tais desafios pós-natais precoces, têm sido associados ao risco de programação do desenvolvimento de doenças na vida adulta, provavelmente devido ao aumento do estresse oxidativo no SNC (ARCEGO *et al.*, 2013; ARCEGO *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2015; SARKAR *et al.*, 2019; SCHIAVONE *et al.*, 2015) e alteração na função dependente do hipocampo e do eixo HPA (ARCEGO *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2020). Embora tenha sido relatado que o desmame precoce prejudica a sinalização do BDNF (KIKUSUI; ICHIKAWA; *et al.*, 2009; KIKUSUI *et al.*, 2019) e interfere no sistema 5-HT (TAVARES *et al.*, 2020), diminui a neurogênese (KIKUSUI; MORI, 2009), altera a formação de mielina (KIKUSUI *et al.*, 2007; KODAMA *et al.*, 2008) e aumenta a ansiedade social e o

comportamento de resposta ao estresse (IWATA *et al.*, 2007; KIKUSUI *et al.*, 2004), ainda não foram relatados os efeitos do desmame precoce sobre parâmetros oxidativos e função mitocondrial no encéfalo de filhotes de ratos.

As mitocôndrias são organelas responsáveis por diversos processos celulares, incluindo manutenção da homeostase redox, fosforilação oxidativa para produzir ATP (MCBRIDE *et al.*, 2006), homeostase de cálcio (KAMER; MOOTHA, 2015), apoptose e autofagia (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). Sua função está intrinsicamente ligada à produção de espécies reativas (HALLIWELL, 2006). Não encontramos alterações significativas na massa e no potencial de membrana mitocondrial ou nos níveis de superóxido mitocondriais no encéfalo dos filhotes aos 21 dias de idade submetidos ao desmame precoce. Entretanto observamos uma tendência, estatisticamente não significativa, na diminuição na funcionalidade mitocondrial combinado com um aumento nos níveis de superóxido mitocondriais no hipocampo das fêmeas, efeito qual foi dependente do aumento no grau de severidade do modelo de desmame precoce. Diversos estudos mostram os efeitos em longo prazo da mudança nutricional na função mitocondrial, no entanto, poucos dados mostram os efeitos em curto prazo. Até o momento, não há estudos investigando parâmetros mitocondriais em filhotes desmamados precocemente no SNC; no entanto, outros modelos de desafios nutricionais ou de estresse no início da vida mostraram alterações mitocondriais no encéfalo de ratos adultos (FERREIRA *et al.*, 2015; FILIPOVIC *et al.*, 2011; TONIAZZO *et al.*, 2019). CIGLIANO *et al.* (2018), mostraram que parâmetros mitocondriais, como atividades de citrato sintase e citocromo c oxidase ou imunoconteúdo do co-ativador 1- $\alpha$  do receptor ativado por proliferação de peroxissomos (PGC-1 $\alpha$ , do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*), não foram alterados no hipocampo de ratos com 25 dias de idade que foram submetidos à alimentação com frutose em curto prazo, apesar de exibirem níveis alterados de marcadores inflamatórios e

peroxidação lipídica. Por outro lado, no mesmo estudo, os autores observaram atividade reduzida da citrato sintase e citocromo c oxidase, bem como redução do imunoconteúdo do PCG-1 $\alpha$  no hipocampo de ratos aos 90 dias de idade (CIGLIANO *et al.*, 2018). Com base nesses dados, pode ser que ocorram alterações mitocondriais no encéfalo de ratos desmamados precocemente com idade superior a 21 dias de vida, sendo necessários mais estudos para entender como os parâmetros mitocondriais respondem em longo prazo frente ao desmame precoce.

Sob condições normais, o metabolismo gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o sistema antioxidante que funciona adequadamente é capaz de remover as espécies reativas impedindo o dano oxidativo celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Encontramos uma interação entre o desmame precoce e o sexo, referente à oxidação da diclorofluoresceína (DCFH) no hipotálamo, indicando que o desmame precoce induz um aumento nos níveis de espécies reativas nas fêmeas em comparação aos machos. Além disso, encontramos níveis aumentados de óxido nítrico no hipocampo de filhotes machos do grupo bromocriptina. A principal fonte de óxido nítrico no hipocampo é a nNOS (ZHOU *et al.*, 2007), cuja expressão é positivamente regulada por GC, hormônio sob controle do eixo HPA e liberado em condições de estresse (ZHOU *et al.*, 2011). O eixo HPA é um componente importante nas respostas aos estressores, sua ativação é dada por uma série de eventos iniciados nos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo resultando na liberação do hormônio liberador de corticotropina (HLC) e arginina vasopressina (AVP), quais através da circulação estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH, do inglês *adrenocorticotropic hormone*) das células corticotróficas da adenohipófise na circulação geral (ANTONI, 1986; SPIGA *et al.*, 2014; VALE *et al.*, 1981). O ACTH estimula a glândula adrenal para produção e liberação de GC, aumentando transitoriamente as concentrações sistêmicas (DALLMAN *et al.*, 1987; GOEL *et al.*, 2014). Sob condições de estresse, um aumento de GC ocorre no hipocampo, qual é respon-

sável pelo feedback negativo no núcleo paraventricular no hipotálamo, reduzindo assim a atividade do eixo HPA e conseqüentemente mantendo a homeostase da atividade do eixo (ZHU *et al.*, 2014). O excesso de óxido nítrico no hipocampo resulta na interrupção da função dos receptores de GC, interrompendo a modulação do feedback negativo e induzindo a hiperatividade do eixo HPA (ZHU *et al.*, 2014). Alguns estudos têm mostrado mudanças no eixo HPA devido ao estresse no início da vida (BACOU *et al.*, 2017; PISU *et al.*, 2016; VARGAS *et al.*, 2016), incluindo modelos de desmame precoce (AISA *et al.*, 2008; KANARI *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2019; PLOTSKY; MEANEY, 1993; VEENEMA; NEUMANN, 2009). DE MOURA *et al.* (2009) mostraram que o desmame precoce farmacológico aumentou os níveis plasmáticos de GC em ratos machos adultos, mas os níveis de GC permaneceram inalterados após desmame precoce não farmacológico (LIMA *et al.*, 2013). Estes resultados poderiam explicar a mudança observada apenas nos ratos machos do grupo bromocriptina.

No presente estudo, não encontramos danos aos lipídios no hipocampo e no hipotálamo de filhotes fêmeas desmamadas precocemente, no entanto, os níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de filhotes fêmeas foram maiores que nos filhotes machos. Além disso os filhotes machos desmamados precocemente por separação materna, tanto por adoção quanto sem adoção, apresentaram altos níveis de peroxidação lipídica no hipotálamo em comparação aos filhotes machos do grupo controle. A peroxidação lipídica é um processo complexo mediado por espécies reativas (RAMANA *et al.*, 2014). Neste processo ocorre danos aos lipídios, principais constituintes das membranas celulares, danificando a integridade celular (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; RAMANA *et al.*, 2014). Os produtos formados por meio da oxidação lipídica propagam o efeito do estresse oxidativo, modulando diretamente as funções e respostas celulares (BINDER *et al.*, 2016). O SNC possui uma alta concentração de lipídios, pois devido às suas diversas funções vitais, é necessário uma complexa rede neuronal envolta por mielina, uma membrana altamente enriquecida de lipídios (CERMENATI *et al.*, 2015; HUSSAIN *et al.*,

2019), assim tornando o encéfalo altamente suscetível ao ataque por espécies reativa. Estudos têm mostrado que o hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, de filhotes machos submetidos à separação materna no início da vida apresentaram um desequilíbrio do estado redox e aumento da peroxidação lipídica (ALMEIDA *et al.*, 2018; DANIELS *et al.*, 2012; UYSAL *et al.*, 2005). Em conjunto, esses achados sugerem que a os filhotes machos são mais suscetíveis do que as fêmeas. Entretanto, não podemos descartar que outras biomoléculas não avaliadas possam ser danificadas por espécies reativas no encéfalo de fêmeas desmamadas precocemente.

As principais enzimas antioxidantes para destoxificação das ERO são a SOD, a CAT e a GPx. Observamos uma interação no hipocampo entre o desmame precoce e o sexo dos animais na atividade das enzimas SOD e GPx, onde a atividade estava aumentada em filhotes fêmeas desmamadas precocemente em relação ao grupo controle e inalterada em filhotes machos. No hipotálamo, a atividade da SOD em filhotes fêmeas foi menor do que nos machos, e o oposto foi observado na atividade da GPx. Nossos achados sugerem que filhotes fêmeas desmamadas precocemente apresentaram maior atividade das enzimas antioxidantes do que os filhotes machos. Além disso, alguns autores sugerem que um desequilíbrio na razão SOD/GPX + CAT têm maior relevância do que as atividades das enzimas individualmente pois as três enzimas trabalham em conjunto nos meios biológicos a fim de eliminar superóxido e peróxido de hidrogênio (DE HAAN *et al.*, 1995; KOSTKA *et al.*, 1998; KOZAKIEWICZ *et al.*, 2019). Um desequilíbrio entre essa razão enzimática resultaria em acúmulo de  $H_2O_2$ , qual é a principal espécie reativa que oxida DCFH (DE HAAN *et al.*, 1995). Considerando que o SNC é rico em íons ferro (FLOYD; CARNEY, 1992), o acúmulo de  $H_2O_2$  facilitaria a ocorrência da reação de Fenton, promovendo a formação de radicais hidroxila (DE HAAN *et al.*, 1995). No presente estudo, observamos aumento da razão SOD/GPx + CAT no hipocampo de filhotes fêmeas desmamadas precocemente por separação materna, com ou sem adoção, em comparação ao grupo controle,

sugerindo que houve um acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém sem alterações na oxidação de DCFH nesta estrutura.

Além disso, investigamos a atividade da enzima GLO1, enzima que não atua diretamente nas espécies reativas de oxigênio, mas é uma importante enzima nas defesas celulares contra a glicação (THORNALLEY, 2005). O sistema glioxalase atua sobre os produtos secundários tóxicos da via glicolítica, como o MG. O MG é formado principalmente nas células pela degradação não enzimática de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) (PHILLIPS; THORNALLEY, 1993). O MG é responsável pela formação de AGEs que contribuem para a citotoxicidade e a inflamação celular (INAGI, 2016). No presente estudo, encontramos aumento da atividade da GLO1 no hipocampo de todos os grupos de fêmeas desmamadas precocemente. O aumento da GLO1 sugere maior eliminação de MG, que pode ter sido alterada no presente estudo devido à mudança do aleitamento materno para uma dieta rica em carboidratos. Considerando essa alteração no perfil dietético, LOCKWOOD *et al.* (1970) demonstraram que ratos submetidos ao desmame precoce no PN15 apresentaram uma indução no perfil enzimático envolvido na lipogênese aos 20 dias de idade.

A amamentação e os cuidados maternos também influenciam o comportamento social da prole (AGOSTI *et al.*, 2017; KROL; GROSSMANN, 2018). Estudos em animais demonstraram aumento do comportamento agressivo, ansioso e depressivo (ISHIKAWA *et al.*, 2015; KANARI *et al.*, 2005; KODAMA *et al.*, 2008) e redução do desempenho cognitivo (POLETTI *et al.*, 2006) após o desmame precoce. Avaliamos o desempenho comportamental em ratos desmamados precocemente aos 60 dias de idade, observamos um comportamento semelhante à ansiedade em filhotes machos do grupo desmamados precocemente por bromocriptina evidenciado pelo menor número de entradas nos braços abertos comparado com o grupo controle no teste labirinto em cruz elevado. Além disso, o desmame farmacológico induziu um déficit na memória de longo prazo nos filhotes machos, medido no teste de reconhecimento de objetos.



Acreditamos que nossos resultados quanto as alterações comportamentais estejam associadas ao estresse materno causado pela administração da bromocriptina. A bromocriptina inibi a produção de prolactina, um hormônio pleiotrópico que participa de diversos processos celulares, tais como angiogênese, resposta imune, osmorregulação, comportamento reprodutivo e lactogênese (CABRERA-REYES *et al.*, 2017). Além disso, juntamente com o estradiol, oxitocina e progesterona, a prolactina compõe o circuito neuronal materno que influencia no comportamento da mãe no período pós-parto (BRIDGES, 2015). O robusto circuito hormonal é essencial para uma melhor interação mãe-prole (BUHIMSCHI, 2004), principalmente através de alterações nas funções basais do eixo HPA nas mães (DUTHIE; REYNOLDS, 2013; HILLERER *et al.*, 2011). A atenuação da reatividade do eixo HPA frente ao estresse causado pela lactação é necessária para o desenvolvimento pós-natal normal da prole, principalmente devido à redução da ansiedade causada nas mães (HILLERER *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 1992). A prolactina vem demonstrando exercer um papel ansiolítico nas mães durante a lactação. Em estudos em ratos e camundongos *knockout* para os receptores de prolactina na área pré-óptica medial, as mães exibiram um comprometimento dos cuidados maternos (BROWN *et al.*, 2017; LUMPKIN *et al.*, 1983). Além disso, o bloqueio seletivo de receptores centrais de prolactina na lactação aumentou a secreção de corticotrofina e corticosterona em resposta ao estresse, além de aumentar o comportamento relacionado à ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado e prejudicar o comportamento materno (TORNER *et al.*, 2002).

Em relação à memória, estudos tem demonstrando que eventos prejudiciais na primeira infância possuem efeitos deletérios à memória (METZ *et al.*, 2018; REINCKE; HANGANU-OPATZ, 2017; SALEH *et al.*, 2017). Em roedores, durante o período de lactação as redes neurais ainda estão em desenvolvimento, principalmente no hipocampo, estrutura responsável pelo processamento de aprendizado e memória (ANDRADE *et al.*, 1996; KNIERIM, 2015; OPITZ, 2014). A memória de reconhecimento é o processo qual ocorre o reconhecimento de algo ou

situação que já foi experimentado anteriormente (STECKLER *et al.*, 1998). Curiosamente, no presente estudo observamos que apenas os machos do grupo desmamado precocemente por bromocriptina apresentaram um menor índice de memória de reconhecimento, além disso este grupo também apresentou maiores níveis de óxido nítrico no hipocampo aos 21 dias de idade.

O NO têm um papel fundamental na memória e aprendizado, visto que o bloqueio da NOS prejudica o processo de aprendizagem (PRAST; PHILIPPU, 2001). Em uma revisão sobre o papel do NO e a memória de reconhecimento de objeto, PITSIKAS (2015) concluiu que o NO está envolvido neste processo, além disso camundongos knockout para nNOS demonstraram memória de reconhecimento prejudicada (ZOUBOVSKY *et al.*, 2011). Anteriormente discutimos que os níveis de NO podem influenciar na expressão dos receptores de GC (ZHU *et al.*, 2014), e que desmame precoce demonstrou que os ratos machos desmamados farmacologicamente apresentaram aumento dos níveis de GC (DE MOURA *et al.*, 2009), porém os filhotes desmamado sem intervenção farmacológica não apresentaram esta alteração (LIMA *et al.*, 2013). Os GC são hormônios esteroides importantes para preparar os indivíduos para situações estressantes, porém o estresse também promove respostas adaptativas em relação à memória (ROOZENDAAL *et al.*, 2009). Entretanto os efeitos dos GC parecem ser dose-depende, quais apresentando uma curva em formato de U invertido, onde concentrações altas e baixas poderiam prejudicar a consolidação da memória (DE QUERVAIN *et al.*, 2017). Além disso, a memória de longa duração parece ser prejudicada através da modulação dos receptores de GC (ROOZENDAAL *et al.*, 2011). Sabendo que o aumento dos níveis de NO podem influenciar a expressão dos receptores GC no hipocampo, acreditamos que possivelmente os níveis aumentados de NO aos 21 dias de idade nos machos desmamados farmacologicamente aos 16 dias de vida, poderia explicar o déficit de memória de longa duração apresentado aos 60 dias de idade, porém mais investigações serão necessárias para entender as diferenças observadas entre os desmames e o mecanismo qual o NO pode estar influenciando na memória destes animais.

Diferentes tipos de desmame foram capazes de promover alterações desiguais nos parâmetros avaliados no presente estudo. Estas diferentes alterações encontradas podem ser devido ao mascaramento ou interação entre os efeitos da privação materna com os efeitos da inibição farmacológica da lactação, que produzem diversos fatores de confusão, como alto estresse ou efeitos colaterais dos medicamentos (FRAGA *et al.*, 2014). Além disso, a qualidade do cuidado materno pode estar interferindo nos resultados observados. Alguns autores têm demonstrando que o tratamento com bromocriptina durante o período de gestação e lactação promove alterações no cuidado materno (BRIDGES; RONSHEIM, 1990; PRICE; BRIDGES, 2014). Além disso, dados de IWATA *et al.* (2007) indicam que as mães adotivas virgens possuem diferentes níveis de ansiedade em comparação com as mães biológicas, já que estes animais demonstraram menores taxas de repouso e maiores taxas de construção de ninhos, alterações que influenciam na quantidade e qualidade do cuidado materno. Além disso a separação materna no modelo de desmame precoce promove alterações significativas tanto fisiologicamente quanto nos parâmetros comportamentais (KIKUSUI; MORI, 2009). Assim, no presente estudo, podemos observar que todos os grupos tinham em comum a falta de leite, entretanto o cuidado materno parece ser mais decisivo nas alterações no SNC do que o leite em si.

Os parâmetros avaliados no SNC da prole apresentaram efeitos sexo-dependentes aos 21 dias de vida, mesmo sendo o período que não há secreção de hormônios gonadais, visto que o período da puberdade em roedores se dá entre 28 a 35 dias de idade (MOLENDIA-FIGUEIRA *et al.*, 2017). Porém, os hormônios esteroides sexuais influenciam não somente o desenvolvimento sexual, mas também atuam em momentos críticos do desenvolvimento do encéfalo (DURDIAKOVA *et al.*, 2011). Além disso, observamos que o desmame precoce foi capaz de alterar de forma diferente as regiões encefálicas avaliadas, hipocampo e hipotálamo. Em roedores, o desenvolvimento destas estruturas começa durante a gestação e termina durante o pe-

ríodo pós-natal. Essas janelas de desenvolvimento nas quais representam um período de vulnerabilidade ao SNC, podem ser moduladas por alterações ambientais e/ou nutricionais (BOURET, 2010; URBAN; GUILLEMOT, 2014). Essas diferenças de maturação vinculadas ao dimorfismo sexual poderiam explicar os resultados distintos ao longo do nosso estudo.

## 5. Conclusão

Em conclusão, observamos que o desmame no 16º dia pós-natal altera os parâmetros neuroquímicos em filhotes de 21 dias de idade. Os filhotes machos e fêmeas foram afetados diferentemente pelo desmame precoce, indicando haver influência do dimorfismo sexual. Além disso, o SNC da prole parece ser mais influenciado pelos cuidados maternos e pelas condições de criação da prole do que pela falta de leite *per se* durante o período tardio da amamentação.

O desequilíbrio do estado redox pode ser responsável pelo desencadeamento de processos patológicos, como doenças metabólicas, cardiovasculares e neurodegenerativas. No presente estudo, observamos alterações nas principais enzimas do sistema antioxidante, além de observar alteração na oxidação de DCFH, aumento de óxido nítrico e peroxidação lipídica nas estruturais encefálicas. Também observamos um déficit na memória de longa duração de reconhecimento de objetos e um comportamento tipo ansioso nos animais desmamados precocemente. Apesar dos nossos achados, as consequências dessas alterações proporcionadas pelo desmame precoce sobre os processos patológicos ainda são uma incógnita, principalmente sobre o SNC, devido aos poucos estudos neste campo de pesquisa. Assim serão necessários mais estudos para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes às alterações neuroquímicas induzidas por diferentes tipos de desmame precoce e como estas alterações podem refletir no desenvolvimento do indivíduo na vida adulta.

## Referências

AGOSTI, M.; TANDOI, F.; MORLACCHI, L.; BOSSI, A. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. **Pediatr Med Chir**, 39, n. 2, p. 157, Jun 28 2017.

AHOLA, M. K.; VAPALAHTI, K.; LOHI, H. Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 10412, Sep 4 2017.

AISA, B.; TORDERA, R.; LASHERAS, B.; DEL RIO, J.; RAMIREZ, M. J. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. **Neuroscience**, 154, n. 4, p. 1218-1226, Jul 17 2008.

ALI, S. S.; AHSAN, H.; ZIA, M. K.; SIDDIQUI, T.; KHAN, F. H. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **J Food Biochem**, p. e13145, Jan 20 2020.

ALMEIDA, P. M. D.; KAMATH, S. U.; SHENOY, P. R.; BERNHARDT, L. K.; KISHORE, A.; RAI, K. S. Persistent attenuation of brain oxidative stress through aging in perinatal maternal separated rat pups supplemented with choline and docosahexaenoic acid or *Clitoria ternatea* aqueous root extract. **Folia Neuropathol**, 56, n. 3, p. 206-214, 2018.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; REMLEY, D. T. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. **Am J Clin Nutr**, 70, n. 4, p. 525-535, Oct 1999.

ANDRADE, J. P.; CASTANHEIRA-VALE, A. J.; PAZ-DIAS, P. G.; MADEIRA, M. D.; PAULA-BARBOSA, M. M. The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. **Exp Brain Res**, 109, n. 3, p. 419-433, Jun 1996.

ANGELOVA, P. R.; ABRAMOV, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Lett**, 592, n. 5, p. 692-702, Mar 2018.

ANTONI, F. A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. **Endocr Rev**, 7, n. 4, p. 351-378, Nov 1986.

ARCEGO, D. M.; KROLOW, R.; LAMPERT, C.; NOSCHANG, C.; PETTENUZZO, L. F.; MARCOLIN, M. L.; TONIAZZO, A. P.; DALMAZ, C. Stress during the pre-pubertal period leads to long-term diet-dependent changes in anxiety-like behavior and in oxidative stress parameters in male adult rats. **Neurochem Res**, 38, n. 9, p. 1791-1800, Sep 2013.

ARCEGO, D. M.; KROLOW, R.; LAMPERT, C.; TONIAZZO, A. P.; BERLITZ, C.; LAZZARETTI, C.; SCHMITZ, F.; RODRIGUES, A. F.; WYSE, A. T.; DALMAZ, C. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects. **Int J Dev Neurosci**, 50, p. 16-25, May 2016.

AZARA, C. R.; MAIA, I. C.; RANGEL, C. N.; SILVA-NETO, M. A.; SERPA, R. F.; DE JESUS, E. F.; TAVARES DO CARMO, M. G.; FIALHO, E. Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups. **Biological research**, 41, n. 3, p. 317-330, 2008.

BABIOR, B. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30, p. 141-155, 1997.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**, 109, n. 1, p. 33-44, Jul 2000.

BACOU, E.; HAUROGNE, K.; MIGNOT, G.; ALLARD, M.; DE BEAUREPAIRE, L.; MARCHAND, J.; TERENCE, E.; BILLON, Y.; JACQUES, J.; BACH, J. M.; MORMEDE, P.; HERVE, J.; LIEUBEAU, B. Acute social stress-induced immunomodulation in pigs high and low responders to ACTH. **Physiol Behav**, 169, p. 1-8, Feb 1 2017.

BALE, T. L.; BARAM, T. Z.; BROWN, A. S.; GOLDSTEIN, J. M.; INSEL, T. R.; MCCARTHY, M. M.; NEMEROFF, C. B.; REYES, T. M.; SIMERLY, R. B.; SUSSER, E. S.; NESTLER, E. J. Early life programming and neurodevelopmental disorders. **Biol Psychiatry**, 68, n. 4, p. 314-319, Aug 15 2010.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am**, 60, n. 1, p. 49-74, Feb 2013.

BANNERMAN, D. M.; SPRENGEL, R.; SANDERSON, D. J.; MCHUGH, S. B.; RAWLINS, J. N.; MONYER, H.; SEEBURG, P. H. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nat Rev Neurosci**, 15, n. 3, p. 181-192, Mar 2014.

BARCELLOS, S. R. O. M. J. O. J. **Aspectos Reprodutivos do Touro - Teoria e Prática**. 2015. (Agrolivros).

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, 29, n. 1, p. 113, 2006.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-1437, Nov 1996.

BELFORT, M. B.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; RICH-EDWARDS, J. W.; KLEINMAN, K. P.; OKEN, E.; GILLMAN, M. W. Infant growth and child cognition at 3 years of age. **Pediatrics**, 122, n. 3, p. e689-695, Sep 2008.

BERNARD, N.; JANTZEM, H.; BECKER, M.; PECRIAUX, C.; BENARD-LARIBIERE, A.; MONTASTRUC, J. L.; DESCOTES, J.; VIAL, T.; FRENCH NETWORK OF REGIONAL PHARMACOVIGILANCE, C. Severe adverse effects of bromocriptine in lactation inhibition: a pharmacovigilance survey. **BJOG**, 122, n. 9, p. 1244-1251, Aug 2015.

BETOKO, A.; LIORET, S.; HEUDE, B.; HANKARD, R.; CARLES, S.; FORHAN, A.; REGNAULT, N.; BOTTON, J.; CHARLES, M. A.; DE LAUZON-GUILLAIN, B.; GROUP, E. M.-C. C. S. Influence of infant feeding patterns over the first year of life on growth from birth to 5 years. **Pediatr Obes**, 12 Suppl 1, p. 94-101, Aug 2017.

BIESWAL, F.; AHN, M. T.; REUSENS, B.; HOLVOET, P.; RAES, M.; REES, W. D.; REMACLE, C. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. **Obesity (Silver Spring)**, 14, n. 8, p. 1330-1343, Aug 2006.

BINDER, C. J.; PAPAC-MILICEVIC, N.; WITZTUM, J. L. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. **Nat Rev Immunol**, 16, n. 8, p. 485-497, Aug 2016.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012.

BOHANNON, J. N., 3rd. Flashbulb memories for the space shuttle disaster: a tale of two theories. **Cognition**, 29, n. 2, p. 179-196, Jul 1988.

BONOMO, I. T.; LISBOA, P. C.; PEREIRA, A. R.; PASSOS, M. C.; DE MOURA, E. G. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. **J Endocrinol**, 192, n. 2, p. 339-344, Feb 2007.

BOS, K. J.; FOX, N.; ZEANAH, C. H.; NELSON, C. A. Effects of early psychosocial deprivation on the development of memory and executive function. **Frontiers in behavioral neuroscience**, 3, p. 16, 2009.

BOUERI, B. F. C.; PESSANHA, C. R.; DA COSTA, L. R.; FERREIRA, M. R.; MELO, H. S.; DE ABREU, M. D. C.; PESSOA, L. R.; DA SILVA, P. C. A.; PEREIRA, A. D.; RIBEIRO, D. C.; DE MENESES, J. A.; DA COSTA, C. A. S.; BOAVENTURA, G. T. Body composition in male rats subjected to early weaning and treated with diet containing flour or flaxseed oil after 21 days until 60 days. **J Dev Orig Health Dis**, 6, n. 6, p. 553-557, Dec 2015.



BOURET, S. G. Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. **Forum Nutr**, 63, p. 84-93, 2010.

BRASIL, C. d. L. d. T. **Decreto-Lei nº 5.452, de 1º de maio de 1943, Art. 392**. Acesso em 30 de Janeiro de 2020 1943a. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/del5452.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/del5452.htm).

BRASIL, C. d. L. d. T. **Decreto-Lei nº 5.452, de 1º de maio de 1943, Art. 396**. Acesso em 30 de Janeiro de 2020 1943b. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/del5452.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/del5452.htm).

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinol**, 36, p. 178-196, Jan 2015.

BRIDGES, R. S.; RONSHEIM, P. M. Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. **Endocrinology**, 126, n. 2, p. 837-848, Feb 1990.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta**, 1830, n. 5, p. 3289-3303, May 2013.

BROWN, R. S. E.; AOKI, M.; LADYMAN, S. R.; PHILLIPPS, H. R.; WYATT, A.; BOEHM, U.; GRATTAN, D. R. Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 40, p. 10779-10784, Oct 3 2017.

BUHIMSCHI, C. S. Endocrinology of lactation. **Obstet Gynecol Clin North Am**, 31, n. 4, p. 963-979, xii, Dec 2004.

CABRERA-REYES, E. A.; LIMON-MORALES, O.; RIVERO-SEGURA, N. A.; CAMACHO-ARROYO, I.; CERBON, M. Prolactin function and putative expression in the brain. **Endocrine**, 57, n. 2, p. 199-213, Aug 2017.

CALDEIRA, A. P.; GOULART, E. M. A situação do aleitamento materno em Montes Claros, Minas Gerais: estudo de uma amostra representativa. **J Pediatr (Rio J)**, 76, n. 1, p. 65-72, 2000.

CAMERON, N. M.; CHAMPAGNE, F. A.; PARENT, C.; FISH, E. W.; OZAKI-KURODA, K.; MEANEY, M. J. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. **Neurosci Biobehav Rev**, 29, n. 4-5, p. 843-865, 2005.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol**, 51, p. 15-25, Jan 2013.

CERMENATI, G.; MITRO, N.; AUDANO, M.; MELCANGI, R. C.; CRESTANI, M.; DE FABIANI, E.; CARUSO, D. Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology. **Biochim Biophys Acta**, 1851, n. 1, p. 51-60, Jan 2015.

CHABAN, Y.; BOEKEMA, E. J.; DUDKINA, N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. **Biochim Biophys Acta**, 1837, n. 4, p. 418-426, Apr 2014.

CHAKI, M.; LINDERMAYR, C. S-Nitrosoglutathione reductase: key regulator of plant development and stress response. *In: Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology*: Springer, 2014. p. 139-151.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979.

CIGLIANO, L.; SPAGNUOLO, M. S.; CRESCENZO, R.; CANCELLIERE, R.; IANNOTTA, L.; MAZZOLI, A.; LIVERINI, G.; IOSSA, S. Short-Term Fructose Feeding Induces Inflammation and Oxidative Stress in the Hippocampus of Young and Adult Rats. **Mol Neurobiol**, 55, n. 4, p. 2869-2883, Apr 2018.

COUPE, B.; DUTRIEZ-CASTELOOT, I.; BRETON, C.; LEFEVRE, F.; MAIRESSE, J.; DICKES-COOPMAN, A.; SILHOL, M.; TAPIA-ARANCIBIA, L.; LESAGE, J.; VIEAU, D. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. **J Neuroendocrinol**, 21, n. 1, p. 40-48, Jan 2009.

DA COSTA, C. A. S.; ALVES, E. G.; GONZALEZ, G. d. P. L.; BARBOSA, T. B. C.; CARLOS, A. S.; LIMA, V. D.; NASCIMENTO, R.; DE MOURA, E. G.; DO NASCIMENTO-SABA, C. C. A. Evaluation of body development, fat mass and lipid profile in rats fed with high-PUFA and-MUFA diets, after neonatal malnutrition. **British journal of nutrition**, 101, n. 11, p. 1639-1644, 2008.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; JACOBSON, L.; LEVIN, N.; CASCIO, C. S.; SHINSAKO, J. Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. **Ann N Y Acad Sci**, 512, p. 402-414, 1987.

DANIELS, W. M.; MARAIS, L.; STEIN, D. J.; RUSSELL, V. A. Exercise normalizes altered expression of proteins in the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation. **Exp Physiol**, 97, n. 2, p. 239-247, Feb 2012.

DE HAAN, J. B.; CRISTIANO, F.; IANNELLO, R. C.; KOLA, I. Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. **Biochem Mol Biol Int**, 35, n. 6, p. 1281-1297, May 1995.

DE MOURA, E. G.; BONOMO, I. T.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; DE OLIVEIRA, E.; TREVENZOLI, I. H.; REIS, A. M.; PASSOS, M. C.; LISBOA, P. C. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. **J Physiol**, 587, n. Pt 20, p. 4919-4929, Oct 15 2009.

DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. **Nat Rev Neurosci**, 18, n. 1, p. 7-19, Jan 2017.

DE TULLIO, M. C.; ASARD, H. Molecules tell stories: Reactive Oxygen, Nitrogen, Carbonyl and Sulfur Species take center stage. **Plant Physiol Biochem**, 59, p. 1-2, Oct 2012.

DEL BONO, E.; RABE, B. **Breastfeeding and child cognitive outcomes: Evidence from a hospital-based breastfeeding support policy**. ISER Working Paper Series. 2012.

DOS SANTOS OLIVEIRA, L.; DE LIMA, D. P.; DA SILVA, A. A.; DA SILVA, M. C.; DE SOUZA, S. L.; MANHAES-DE-CASTRO, R. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. **Behav Processes**, 86, n. 1, p. 75-80, Jan 2011.

DURDIAKOVA, J.; OSTATNIKOVA, D.; CELEC, P. Testosterone and its metabolites--modulators of brain functions. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, 71, n. 4, p. 434-454, 2011.

DUTHIE, L.; REYNOLDS, R. M. Changes in the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and postpartum: influences on maternal and fetal outcomes. **Neuroendocrinology**, 98, n. 2, p. 106-115, 2013.

ESTEBAN-CORNEJO, I.; HENRIKSSON, P.; CADENAS-SANCHEZ, C.; VANHELST, J.; FORSNER, M.; GOTTRAND, F.; KERSTING, M.; MORENO, L. A.; RUIZ, J. R.; WIDHALM, K.; ORTEGA, F. B.; GROUP, H. s. Early life programming of attention capacity in adolescents: The HELENA study. **Matern Child Nutr**, Apr 11 2017.

FERNSTROM, J. D. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. **Lipids**, 34, n. 2, p. 161-169, Feb 1999.

FERREIRA, C. F.; BERNARDI, J. R.; DA SILVA, D. C.; DE SA COUTO-PEREIRA, N.; DE SOUZA MOTA, C.; KROLOW, R.; WEIS, S. N.; PETTENUZZO, L.; KAPCZINSKI, F.;

SILVEIRA, P. P.; DALMAZ, C. Mitochondrial and Oxidative Stress Aspects in Hippocampus of Rats Submitted to Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency After Exposure to Early Stress. **Neurochem Res**, 40, n. 9, p. 1870-1881, Sep 2015.

FILIPOVIC, D.; ZLATKOVIC, J.; INTA, D.; BJELOBABA, I.; STOJILJKOVIC, M.; GASS, P. Chronic isolation stress predisposes the frontal cortex but not the hippocampus to the potentially detrimental release of cytochrome c from mitochondria and the activation of caspase-3. **J Neurosci Res**, 89, n. 9, p. 1461-1470, Sep 2011.

FLOYD, R. A.; CARNEY, J. M. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. **Ann Neurol**, 32 Suppl, p. S22-27, 1992.

FRAGA, M. C.; DE MOURA, E. G.; DA SILVA LIMA, N.; LISBOA, P. C.; DE OLIVEIRA, E.; SILVA, J. O.; CLAUDIO-NETO, S.; FILGUEIRAS, C. C.; ABREU-VILLACA, Y.; MANHAES, A. C. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. **Physiol Behav**, 124, p. 100-106, Jan 30 2014.

FRAGA, M. C.; MOURA, E. G.; SILVA, J. O.; BONOMO, I. T.; FILGUEIRAS, C. C.; ABREU-VILLACA, Y.; PASSOS, M. C.; LISBOA, P. C.; MANHAES, A. C. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. **Pharmacol Biochem Behav**, 100, n. 1, p. 165-173, Nov 2011.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, 64, p. 97-112, 1995.

FUGE, P.; AUST, S.; FAN, Y.; WEIGAND, A.; GÄRTNER, M.; FEESER, M.; BAJBOUJ, M.; GRIMM, S. Interaction of early life stress and corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on working memory. **Biological Psychiatry**, 76, n. 11, p. 888-894, 2014.

GALTRY, J. Lactation and the labor market: breastfeeding, labor market changes, and public policy in the United States. **Health Care Women Int**, 18, n. 5, p. 467-480, Sep-Oct 1997.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**, 2012, p. 428010, 2012.

GARTNER, L. M.; MORTON, J.; LAWRENCE, R. A.; NAYLOR, A. J.; O'HARE, D.; SCHANLER, R. J.; EIDELMAN, A. I.; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS SECTION ON, B. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, 115, n. 2, p. 496-506, Feb 2005.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, 482, n. 3, p. 419-425, Jan 15 2017.

GERRISH, C. J.; ONISCHAK, C. M.; ALBERTS, J. R. Acute, early thermal experience alters weaning onset in rats. **Physiology & behavior**, 64, n. 4, p. 463-474, 1998.

GOEL, N.; WORKMAN, J. L.; LEE, T. T.; INNALA, L.; VIAU, V. Sex differences in the HPA axis. **Compr Physiol**, 4, n. 3, p. 1121-1155, Jul 2014.

GONÇALVES, M. R. S.; CADETE, M. M. M. Ministério da Saúde. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal. **Brasília. 1ª edição**, 2009.

GONZALEZ, H. F.; VISENTIN, S. Nutrients and neurodevelopment: lipids. **Arch Argent Pediatr**, 114, n. 5, p. 472-476, Oct 1 2016.

HAHN, P.; KOLDOVSKÝ, O.; KERKUT, G. A. **Utilization of Nutrients During Postnatal Development: International Series of Monographs in Pure and Applied Biology: Zoology**. Elsevier Science, 2013. 9781483185934.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, 141, n. 2, p. 312-322, Jun 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends Pharmacol Sci**, 32, n. 3, p. 125-130, Mar 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J**, 219, n. 1, p. 1-14, Apr 1 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. : Pergamon 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. 0198717482.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fourth Edition ed. 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, 142, n. 2, p. 231-255, May 2004.

HANSFORD, R. G.; HOGUE, B. A.; MILDAZIENE, V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. **J Bioenerg Biomembr**, 29, n. 1, p. 89-95, Feb 1997.

HANSON, J. L.; CHUNG, M. K.; AVANTS, B. B.; RUDOLPH, K. D.; SHIRTCLIFF, E. A.; GEE, J. C.; DAVIDSON, R. J.; POLLAK, S. D. Structural variations in prefrontal cortex mediate the relationship between early childhood stress and spatial working memory. **J Neurosci**, 32, n. 23, p. 7917-7925, Jun 6 2012.

HARPER, M. E.; BEVILACQUA, L.; HAGOPIAN, K.; WEINDRUCH, R.; RAMSEY, J. J. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. **Acta Physiol Scand**, 182, n. 4, p. 321-331, Dec 2004.

HE, K. J.; ZHANG, Y. T.; WEI, S. Z.; JIANG, S. M.; XU, L.; REN, C.; WANG, F. Impact of Maternal Separation on Dopamine System and its Association with Parkinson's Disease. **Neuromolecular Med**, Jan 13 2020.

HILLERER, K. M.; REBER, S. O.; NEUMANN, I. D.; SLATTERY, D. A. Exposure to chronic pregnancy stress reverses peripartum-associated adaptations: implications for postpartum anxiety and mood disorders. **Endocrinology**, 152, n. 10, p. 3930-3940, Oct 2011.

HONEK, J. F. Glyoxalase biochemistry. **Biomol Concepts**, 6, n. 5-6, p. 401-414, Dec 2015.

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, 104, n. 467, p. 14-19, Dec 2015.

HUANG, Q.; XU, W.; BAI, K. W.; HE, J. T.; AHMAD, H.; ZHOU, L.; ZHANG, L. L.; WANG, T. Protective effects of leucine on redox status and mitochondrial-related gene abundance in the jejunum of intrauterine growth-retarded piglets during early weaning period. **Arch Anim Nutr**, 71, n. 2, p. 93-107, Apr 2017.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.

HUSSAIN, G.; WANG, J.; RASUL, A.; ANWAR, H.; IMRAN, A.; QASIM, M.; ZAFAR, S.; KAMRAN, S. K. S.; RAZZAQ, A.; AZIZ, N.; AHMAD, W.; SHABBIR, A.; IQBAL, J.; BAIG, S. M.; SUN, T. Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. **Lipids Health Dis**, 18, n. 1, p. 26, Jan 25 2019.

ILCHMANN-DIOUNOU, H.; OLIER, M.; LENCINA, C.; RIBA, A.; BARRETTO, S.; NANKAP, M.; SOMMER, C.; GUILLOU, H.; ELLERO-SIMATOS, S.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; THEODOROU, V.; MENARD, S. Early life stress induces type 2 diabetes-like features in ageing mice. **Brain Behav Immun**, 80, p. 452-463, Aug 2019.

ILO. **Maternity protection convention. No. 183**. Acesso em 30 de Janeiro de 2020 2000. Disponível em: [https://www.ilo.org/dyn/normlex/en/f?p=NORMLEXPUB:12100:0::NO::P12100\\_ILO\\_CODE:C183](https://www.ilo.org/dyn/normlex/en/f?p=NORMLEXPUB:12100:0::NO::P12100_ILO_CODE:C183).

ILO. World social protection report 2017–19: Universal social protection to achieve the Sustainable Development Goals. : International Labour Office Geneva 2017.

INAGI, R. RAGE and glyoxalase in kidney disease. **Glycoconj J**, 33, n. 4, p. 619-626, Aug 2016.

INNIS, S. M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **Am J Clin Nutr**, 99, n. 3, p. 734S-741S, Mar 2014.

ISHIKAWA, J.; NISHIMURA, R.; ISHIKAWA, A. Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. **Eur J Neurosci**, 41, n. 4, p. 442-453, Feb 2015.

IWATA, E.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Fostering and environmental enrichment ameliorate anxious behavior induced by early weaning in Balb/c mice. **Physiol Behav**, 91, n. 2-3, p. 318-324, Jun 8 2007.

IZQUIERDO, I. **Memória-3**. Artmed Editora, 2018. 8582714920.

JONES, D. P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. **Chem Biol Interact**, 163, n. 1-2, p. 38-53, Oct 27 2006.

KAMER, K. J.; MOOTHA, V. K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 16, n. 9, p. 545-553, Sep 2015.

KANARI, K.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behav Brain Res**, 156, n. 1, p. 45-52, Jan 6 2005.

KAUFMAN, D.; BANERJI, M. A.; SHORMAN, I.; SMITH, E. L.; COPLAN, J. D.; ROSENBLUM, L. A.; KRAL, J. G. Early-life stress and the development of obesity and insulin resistance in juvenile bonnet macaques. **Diabetes**, 56, n. 5, p. 1382-1386, May 2007.

KIKUSUI, T.; ICHIKAWA, S.; MORI, Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. **Psychoneuroendocrinology**, 34, n. 5, p. 762-772, Jun 2009.

KIKUSUI, T.; KANBARA, N.; OZAKI, M.; HIRAYAMA, N.; IDA, K.; TOKITA, M.; TANABE, N.; MITSUYAMA, K.; ABE, H.; YOSHIDA, M.; NAGASAWA, M.; MOGI, K. Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 3991, Mar 8 2019.

KIKUSUI, T.; KIYOKAWA, Y.; MORI, Y. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain Res**, 1133, n. 1, p. 115-122, Feb 16 2007.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. **J Neuroendocrinol**, 21, n. 4, p. 427-431, Mar 2009.

KIKUSUI, T.; NAKAMURA, K.; KAKUMA, Y.; MORI, Y. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. **Behav Brain Res**, 175, n. 1, p. 96-103, Nov 25 2006.

KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. **Physiol Behav**, 81, n. 1, p. 37-42, Mar 2004.

KIM, H. E.; GRANT, A. R.; SIMIC, M. S.; KOHNZ, R. A.; NOMURA, D. K.; DURIEUX, J.; RIERA, C. E.; SANCHEZ, M.; KAPERNICK, E.; WOLFF, S.; DILLIN, A. Lipid Biosynthesis Coordinates a Mitochondrial-to-Cytosolic Stress Response. **Cell**, 166, n. 6, p. 1539-1552 e1516, Sep 8 2016.

KIM, J. I.; KIM, B. N.; KIM, J. W.; HONG, S. B.; SHIN, M. S.; YOO, H. J.; CHO, S. C. Breastfeeding is associated with enhanced learning abilities in school-aged children. **Child Adolesc Psychiatry Ment Health**, 11, p. 36, 2017.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol**, 25, n. 23, p. R1116-1121, Dec 7 2015.

KODAMA, Y.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Effects of early weaning on anxiety and prefrontal cortical and hippocampal myelination in male and female Wistar rats. **Dev Psychobiol**, 50, n. 4, p. 332-342, May 2008.



KOLETZKO, B. Early nutrition and its later consequences: new opportunities. **Adv Exp Med Biol**, 569, p. 1-12, 2005.

KOSTKA, T.; DRAI, J.; BERTHOUBE, S. E.; LACOUR, J. R.; BONNEFOY, M. Physical activity, fitness and integrated antioxidant system in healthy active elderly women. **Int J Sports Med**, 19, n. 7, p. 462-467, Oct 1998.

KOZAKIEWICZ, M.; ROWINSKI, R.; KORNIATOWSKI, M.; DABROWSKI, A.; KEDZIORA-KORNIATOWSKA, K.; STRACHECKA, A. Relation of Moderate Physical Activity to Blood Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in the Elderly. **Oxid Med Cell Longev**, 2019, p. 5123628, 2019.

KROL, K. M.; GROSSMANN, T. Psychological effects of breastfeeding on children and mothers. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, 61, n. 8, p. 977-985, Aug 2018.

LIMA, N. S.; MOURA, E. G.; FRANCO, J. G.; PINHEIRO, C. R.; PAZOS-MOURA, C. C.; CABANELAS, A.; CARLOS, A. S.; NASCIMENTO-SABA, C. C.; DE OLIVEIRA, E.; LISBOA, P. C. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. **Horm Metab Res**, 45, n. 1, p. 22-30, Jan 2013.

LIMA, S. N.; DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C.; NOGUEIRA NETO, F. J.; REIS, A. M.; DE OLIVEIRA, E.; LISBOA, P. C. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **Br J Nutr**, 105, n. 9, p. 1405-1413, May 2011.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nat Neurosci**, 3, n. 8, p. 799-806, Aug 2000.

LOCKWOOD, E. A.; BAILEY, E.; TAYLOR, C. B. Factors involved in changes in hepatic lipogenesis during development of the rat. **Biochem J**, 118, n. 1, p. 155-162, Jun 1970.

LUMPKIN, M. D.; SAMSON, W. K.; MCCANN, S. M. Hypothalamic and pituitary sites of action of oxytocin to alter prolactin secretion in the rat. **Endocrinology**, 112, n. 5, p. 1711-1717, May 1983.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, 7, n. 2, p. 156-167, Feb 2008.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, 224, p. 164-175, Dec 5 2014.

MAESSEN, D. E.; STEHOUWER, C. D.; SCHALKWIJK, C. G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. **Clin Sci (Lond)**, 128, n. 12, p. 839-861, Jun 2015.

MARAIS, L.; VAN RENSBURG, S. J.; VAN ZYL, J. M.; STEIN, D. J.; DANIELS, W. M. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. **Neurosci Res**, 61, n. 1, p. 106-112, May 2008.

MATHUR, N. B.; DHINGRA, D. Breastfeeding. **Indian J Pediatr**, 81, n. 2, p. 143-149, Feb 2014.

MCBRIDE, H. M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. **Curr Biol**, 16, n. 14, p. R551-560, Jul 25 2006.

MCGAUGH, J. L. **Memory and emotion: The making of lasting memories**. Columbia University Press, 2003. 0231120222.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Curr Opin Neurobiol**, 12, n. 2, p. 205-210, Apr 2002.

METZ, S.; AUST, S.; FAN, Y.; BONKE, L.; HARKI, Z.; GARTNER, M.; BAJBOUJ, M.; GRIMM, S. The influence of early life stress on the integration of emotion and working memory. **Behav Brain Res**, 339, p. 179-185, Feb 26 2018.

MILLER, A. L.; LUMENG, J. C. Pathways of Association from Stress to Obesity in Early Childhood. **Obesity (Silver Spring)**, 26, n. 7, p. 1117-1124, Jul 2018.

MIRANDA, R. A.; PIETROBON, C. B.; BERTASSO, I. M.; RODRIGUES, V. S. T.; LOPES, B. P.; CALVINO, C.; DE OLIVEIRA, E.; DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Early weaning leads to specific glucocorticoid signalling in fat depots of adult rats. **Endocrine**, Sep 7 2019.

MIRESCU, C.; PETERS, J. D.; GOULD, E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. **Nat Neurosci**, 7, n. 8, p. 841-846, Aug 2004.

MOLENDIA-FIGUEIRA, H. A.; BELL, M. R.; DE LORME, K. C.; SISK, C. L. Pubertal pair-housing facilitates adult sexual behavior in male rats. **Dev Psychobiol**, 59, n. 1, p. 111-117, Jan 2017.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

MURPHY, M. O.; COHN, D. M.; LORIA, A. S. Developmental origins of cardiovascular disease: Impact of early life stress in humans and rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, 74, n. Pt B, p. 453-465, Mar 2017.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, 417, n. 1, p. 1-13, Jan 1 2009.

NAKAMURA, K.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behav Brain Res**, 187, n. 2, p. 442-448, Mar 5 2008.

NAVARRO-ROSENBLATT, D.; GARMENDIA, M. L. Maternity Leave and Its Impact on Breastfeeding: A Review of the Literature. **Breastfeed Med**, 13, n. 9, p. 589-597, Nov 2018.

NEISSER, U.; WINOGRAD, E.; BERGMAN, E. T.; SCHREIBER, C. A.; PALMER, S. E.; WELDON, M. S. Remembering the earthquake: direct experience vs. hearing the news. **Memory**, 4, n. 4, p. 337-357, Jul 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition**. Macmillan Learning, 2017. 9781319108243.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1833, n. 12, p. 3448-3459, Dec 2013.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, 31, n. 11, p. 1287-1312, Dec 1 2001.

OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. **Behav Neurosci**, 106, n. 1, p. 62-71, Feb 1992.

OLSON, K. R.; GAO, Y.; ARIF, F.; ARORA, K.; PATEL, S.; DELEON, E. R.; SUTTON, T. R.; FEELISCH, M.; CORTESE-KROTT, M. M.; STRAUB, K. D. Metabolism of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and production of reactive sulfur species (RSS) by superoxide dismutase. **Redox biology**, 15, p. 74-85, 2018.

OPITZ, B. Memory function and the hippocampus. **Front Neurol Neurosci**, 34, p. 51-59, 2014.

PARK, S.; KIM, B. N.; KIM, J. W.; SHIN, M. S.; YOO, H. J.; CHO, S. C. Protective effect of breastfeeding with regard to children's behavioral and cognitive problems. **Nutr J**, 13, n. 1, p. 111, Nov 29 2014.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Ann Nutr Metab**, 58 Suppl 2, p. 18-28, 2011.

PAVÃO, R. Aprendizagem e memória. **Revista da Biologia**, 1, p. 16-20, 2008.

PEIXOTO, T. C.; PIETROBON, C. B.; BERTASSO, I. M.; CARAMEZ, F. A. H.; CALVINO, C.; SANTOS, T. R.; OLIVEIRA, E.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Early weaning alters the thermogenic capacity of brown adipose tissue in adult male and female rats. **Eur J Nutr**, Aug 5 2019.

PENTECOST, M.; ROSS, F. The First Thousand Days: Motherhood, Scientific Knowledge, and Local Histories. **Med Anthropol**, p. 1-15, Apr 4 2019.

PEREIRA, R. S. V.; OLIVEIRA, M. I. C. d.; ANDRADE, C. L. T. d.; BRITO, A. d. S. Factors associated with exclusive breastfeeding: the role of primary health care. **Cadernos de saude publica**, 26, n. 12, p. 2343-2354, 2010.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxid Med Cell Longev**, 2014, p. 427318, 2014.

PETRYK, L.; WEILER, H. A. Sows' milk attenuates dexamethasone-induced reductions in liver docosahexaenoic acid. **Biol Neonate**, 81, n. 3, p. 188-195, 2002.

PHILLIPS, S. A.; THORNALLEY, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. **Eur J Biochem**, 212, n. 1, p. 101-105, Feb 15 1993.

PIETROBON, C. B.; MIRANDA, R. A.; BERTASSO, I. M.; MATHIAS, P. C. F.; BONFLEUR, M. L.; BALBO, S. L.; REIS, M. A. B.; LATORRACA, M. Q.; ARANTES, V. C.; DE OLIVEIRA, E.; LISBOA, P. C.; DE MOURA, E. G. Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in wistar rats of both sexes. **J Physiol**, Dec 11 2019.

PISU, M. G.; GARAU, A.; BOERO, G.; BIGGIO, F.; PIBIRI, V.; DORE, R.; LOCCI, V.; PACI, E.; PORCU, P.; SERRA, M. Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. **Neuroscience**, 320, p. 172-182, Apr 21 2016.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. **Behav Brain Res**, 285, p. 200-207, May 15 2015.

PLAUT, S. M.; DAVIS, J. M. Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels. **Physiol Behav**, 8, n. 1, p. 43-51, Jan 1972.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. 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**, 18, n. 3, p. 195-200, May 1993.

POLETTI, R.; STEIBEL, J. P.; SIEGFORD, J. M.; ZANELLA, A. J. Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets. **Brain Res**, 1067, n. 1, p. 36-42, Jan 5 2006.

POLTRONIERI, P.; TAURINO, M.; BONSEGNA, S.; DE DOMENICO, S.; SANTINO, A. Nitric oxide: Detection methods and possible roles during jasmonate-regulated stress response. *In: Nitric oxide in plants: Metabolism and role in stress physiology*: Springer, 2014. p. 127-138.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol**, 64, n. 1, p. 51-68, May 2001.

PRICE, A. K.; BRIDGES, R. S. The effects of bromocriptine treatment during early pregnancy on postpartum maternal behaviors in rats. **Dev Psychobiol**, 56, n. 6, p. 1431-1437, Sep 2014.

PRYOR, W. A.; SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am J Physiol**, 268, n. 5 Pt 1, p. L699-722, May 1995.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, 21, n. 6, p. 775-777, Jun 2005.

RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. a. N.; NAVILIAT, M.; CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, 30, n. 5, p. 463-488, 2001.

RAMANA, K. V.; SRIVASTAVA, S.; SINGHAL, S. S. Lipid peroxidation products in human health and disease 2014. **Oxid Med Cell Longev**, 2014, p. 162414, 2014.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. **Curr Opin Cell Biol**, 33, p. 8-13, Apr 2015.

REINCKE, S. A.; HANGANU-OPATZ, I. L. Early-life stress impairs recognition memory and perturbs the functional maturation of prefrontal-hippocampal-perirhinal networks. **Sci Rep**, 7, p. 42042, Feb 7 2017.

REZAYIAN, M.; NIKNAM, V.; EBRAHIMZADEH, H. Oxidative damage and antioxidative system in algae. **Toxicol Rep**, 6, p. 1309-1313, 2019.

RICCIARDOLO, F. L.; NIJKAMP, F. P.; FOLKERTS, G. Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Curr Drug Targets**, 7, n. 6, p. 721-735, Jun 2006.

RODRIGUES, V. S. T.; MOURA, E. G.; BERNARDINO, D. N.; CARVALHO, J. C.; SOARES, P. N.; PEIXOTO, T. C.; PEIXOTO-SILVA, N.; OLIVEIRA, E.; LISBOA, P. C. Supplementation of suckling rats with cow's milk induces hyperphagia and higher visceral adiposity in females at adulthood, but not in males. **J Nutr Biochem**, 55, p. 89-103, May 2018.

ROLLINS, N. C.; BHANDARI, N.; HAJEEBHOY, N.; HORTON, S.; LUTTER, C. K.; MARTINES, J. C.; PIWOZ, E. G.; RICHTER, L. M.; VICTORA, C. G.; LANCET BREASTFEEDING SERIES, G. Why invest, and what it will take to improve breastfeeding practices? **Lancet**, 387, n. 10017, p. 491-504, Jan 30 2016.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nat Rev Neurosci**, 10, n. 6, p. 423-433, Jun 2009.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. **Neurobiol Learn Mem**, 67, n. 2, p. 176-179, Mar 1997.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Memory modulation. **Behav Neurosci**, 125, n. 6, p. 797-824, Dec 2011.

RÓSZER, T. **The biology of subcellular nitric oxide**. Springer Science & Business Media, 2012. 9400728190.

SALEH, A.; POTTER, G. G.; MCQUOID, D. R.; BOYD, B.; TURNER, R.; MACFALL, J. R.; TAYLOR, W. D. Effects of early life stress on depression, cognitive performance and brain morphology. **Psychol Med**, 47, n. 1, p. 171-181, Jan 2017.

SANTANA, G. S.; GIUGLIANI, E. R. J.; VIEIRA, T. O.; VIEIRA, G. O. Factors associated with breastfeeding maintenance for 12 months or more: a systematic review. **J Pediatr (Rio J)**, Sep 05 2017.

SARKAR, T.; PATRO, N.; PATRO, I. K. Cumulative multiple early life hits- a potent threat leading to neurological disorders. **Brain Res Bull**, 147, p. 58-68, Apr 2019.

SCHIAVONE, S.; COLAIANNA, M.; CURTIS, L. Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders: relation to brain oxidative stress. **Curr Pharm Des**, 21, n. 11, p. 1404-1412, 2015.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol**, 24, n. 10, p. R453-462, May 19 2014.

SCHINDER, A. F.; POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends Neurosci**, 23, n. 12, p. 639-645, Dec 2000.

SCHWARZLANDER, M.; FINKEMEIER, I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants. **Antioxid Redox Signal**, 18, n. 16, p. 2122-2144, Jun 1 2013.

SIES, H. Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. **Oxidative stress**, 1, p. 73-90, 1985.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, 82, n. 2, p. 291-295, Mar 1997.

SORIGUER, F.; MORENO, F.; ROJO-MARTINEZ, G.; CARDONA, F.; TINAHONES, F.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; GARCIA-FUENTES, E.; MORCILLO, S. Redistribution of abdominal fat after a period of food restriction in rats is related to the type of dietary fat. **Br J Nutr**, 89, n. 1, p. 115-122, Jan 2003.

SPIGA, F.; WALKER, J. J.; TERRY, J. R.; LIGHTMAN, S. L. HPA axis-rhythms. **Compr Physiol**, 4, n. 3, p. 1273-1298, Jul 2014.

SRIVASTAVA, K. K.; KUMAR, R. Stress, oxidative injury and disease. **Indian J Clin Biochem**, 30, n. 1, p. 3-10, Jan 2015.

STECKLER, T.; DRINKENBURG, W.; SAHGAL, A.; AGGLETON, J. Recognition memory in rats—I. Concepts and classification. **Progress in Neurobiology**, 54, n. 3, p. 289-311, 1998.

SYED, S. A.; NEMEROFF, C. B. Early Life Stress, Mood, and Anxiety Disorders. **Chronic Stress (Thousand Oaks)**, 1, Feb 2017.

TAVARES, G. A.; ALMEIDA, L.; DE SOUZA, J. A.; BRAZ, G. R. F.; DA SILVA, M. C.; LAGRANHA, C. J.; DO NASCIMENTO, E.; DE SOUZA, S. L. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations. **Behav Processes**, 170, p. 103981, Nov 1 2019.

TAVARES, G. A.; ALMEIDA, L.; DE SOUZA, J. A.; BRAZ, G. R. F.; DA SILVA, M. C.; LAGRANHA, C. J.; DO NASCIMENTO, E.; DE SOUZA, S. L. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations. **Behav Processes**, 170, p. 103981, Jan 2020.

THIELS, E.; ALBERTS, J. R.; CRAMER, C. P. Weaning in rats: II. Pup behavior patterns. **Dev Psychobiol**, 23, n. 6, p. 495-510, Sep 1990.

THOMAS, D. D. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. **Redox Biol**, 5, p. 225-233, Aug 2015.

THORNALLEY, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. **Gen Pharmacol**, 27, n. 4, p. 565-573, Jun 1996.

THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. **Ann N Y Acad Sci**, 1043, p. 111-117, Jun 2005.

TONIAZZO, A. P.; ARCEGO, D. M.; LAZZARETTI, C.; MOTA, C.; SCHNORR, C. E.; PETTENUZZO, L. F.; KROLOW, R.; FONSECA MOREIRA, J. C.; DALMAZ, C. Sex-dependent effect on mitochondrial and oxidative stress parameters in the hypothalamus induced by prepubertal stress and access to high fat diet. **Neurochem Int**, 124, p. 114-122, Mar 2019.

TORNER, L.; TOSCHI, N.; NAVA, G.; CLAPP, C.; NEUMANN, I. D. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. **Eur J Neurosci**, 15, n. 8, p. 1381-1389, Apr 2002.

TRUONG, T. H.; CARROLL, K. S. Redox regulation of protein kinases. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 48, n. 4, p. 332-356, Jul-Aug 2013.

UNICEF. **Infant and young child feeding**. Acesso em 30 de Janeiro de 2020 2019. Disponível em: <https://data.unicef.org/topic/nutrition/infant-and-young-child-feeding/>.

URBAN, N.; GUILLEMOT, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. **Front Cell Neurosci**, 8, p. 396, 2014.



UYSAL, N.; GONENC, S.; ACIKGOZ, O.; PEKCETIN, C.; KAYATEKIN, B. M.; SONMEZ, A.; SEMIN, I. Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. **Neurosci Lett**, 384, n. 1-2, p. 98-101, Aug 12-19 2005.

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**, 213, n. 4514, p. 1394-1397, Sep 18 1981.

VAN DER BLIEK, A. M.; SEDENSKY, M. M.; MORGAN, P. G. Cell Biology of the Mitochondrion. **Genetics**, 207, n. 3, p. 843-871, Nov 2017.

VAN DER MEULEN, J.; KOOPMANS, S. J.; DEKKER, R. A.; HOOGENDOORN, A. Increasing weaning age of piglets from 4 to 7 weeks reduces stress, increases post-weaning feed intake but does not improve intestinal functionality. **Animal**, 4, n. 10, p. 1653-1661, Oct 2010.

VARGAS, J.; JUNCO, M.; GOMEZ, C.; LAJUD, N. Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. **PLoS One**, 11, n. 9, p. e0162665, 2016.

VEENEMA, A. H.; NEUMANN, I. D. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. **Psychoneuroendocrinology**, 34, n. 3, p. 463-467, Apr 2009.

VICTORA, C. G.; BAHL, R.; BARROS, A. J.; FRANCA, G. V.; HORTON, S.; KRASEVEC, J.; MURCH, S.; SANKAR, M. J.; WALKER, N.; ROLLINS, N. C.; LANCET BREASTFEEDING SERIES, G. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **Lancet**, 387, n. 10017, p. 475-490, Jan 30 2016.

WALKER, C. D.; LIGHTMAN, S. L.; STEELE, M. K.; DALLMAN, M. F. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. **Endocrinology**, 130, n. 1, p. 115-125, Jan 1992.

WHO. **Breastfeeding: a vital emergency response. Are you ready?** , Acesso em 30 de Janeiro de 2020 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383634/#R40>.

WHO. **10 facts on breastfeeding**. Acesso em 15 de Fevereiro de 2020 2015. Disponível em: <https://www.who.int/features/factfiles/breastfeeding/en/>.

WHO, U. The extension of the 2025 maternal, infant and young child nutrition targets to 2030. **Geneva: World Health Organization**, 2018.

XIONG, X.; YANG, H.; TAN, B.; YANG, C.; WU, M.; LIU, G.; KIM, S. W.; LI, T.; LI, L.; WANG, J.; WU, G.; YIN, Y. Differential expression of proteins involved in energy production along the crypt-villus axis in early-weaning pig small intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 309, n. 4, p. G229-237, Aug 15 2015.

ZETH, K. Structure and evolution of mitochondrial outer membrane proteins of beta-barrel topology. **Biochim Biophys Acta**, 1797, n. 6-7, p. 1292-1299, Jun-Jul 2010.

ZHANG, H.; WANG, L.; CHU, Y. Reactive oxygen species: The signal regulator of B cell. **Free Radic Biol Med**, 142, p. 16-22, Oct 2019.

ZHOU, Q. G.; HU, Y.; HUA, Y.; HU, M.; LUO, C. X.; HAN, X.; ZHU, X. J.; WANG, B.; XU, J. S.; ZHU, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J Neurochem**, 103, n. 5, p. 1843-1854, Dec 2007.

ZHOU, Q. G.; ZHU, L. J.; CHEN, C.; WU, H. Y.; LUO, C. X.; CHANG, L.; ZHU, D. Y. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. **J Neurosci**, 31, n. 21, p. 7579-7590, May 25 2011.

ZHU, L. J.; LIU, M. Y.; LI, H.; LIU, X.; CHEN, C.; HAN, Z.; WU, H. Y.; JING, X.; ZHOU, H. H.; SUH, H.; ZHU, D. Y.; ZHOU, Q. G. The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. **PLoS One**, 9, n. 5, p. e97689, 2014.

ZOUBOVSKY, S. P.; POGORELOV, V. M.; TANIGUCHI, Y.; KIM, S. H.; YOON, P.; NWULIA, E.; SAWA, A.; PLETNIKOV, M. V.; KAMIYA, A. Working memory deficits in neuronal nitric oxide synthase knockout mice: potential impairments in prefrontal cortex mediated cognitive function. **Biochem Biophys Res Commun**, 408, n. 4, p. 707-712, May 20 2011.

## Anexos

### Anexo I – Carta de Aprovação da CEUA



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

**Comissão De Ética No Uso De Animais**



#### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 35628

**Título:** INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDA A UM MODELO DE DESMAME PRECOCE

**Vigência:** 13/07/2018 à 28/02/2020

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

CRISTIANE MATTE - coordenador desde 13/07/2018  
CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO - pesquisador desde 13/07/2018  
Juliana Bender Hoppe - pesquisador desde 13/07/2018  
KAROLINE DOS SANTOS RODRIGUES - Aluno de Mestrado desde 13/07/2018  
Caroline Peres Klein - Aluno de Doutorado desde 13/07/2018

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de ratas fêmeas prenhes adultas da espécie Wistar (72 ratas gestantes, considerando 50% de taxa de prenhes), além dos filhotes provenientes da gestação (480 filhotes machos e fêmeas), provenientes do CREAL/UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Terça-Feira, 18 de Setembro de 2018

  
\_\_\_\_\_  
ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Vice Coordenador da comissão de ética

## **Anexo II – Normas de Publicação do Periódico Científico *The International Journal of Developmental Neuroscience***

*The International Journal of Developmental Neuroscience* publishes original research papers, reviews and communications on both basic and clinical aspects of the developing nervous system, ranging from simpler invertebrate systems and in vitro neural models to models of regeneration and neurological diseases of developmental origin. Papers focused on translational research considering genetic and epigenetic approaches to behavior and nutrition, just two examples, are also encouraged.

The journal encourages the publication of Special Issues dealing with topics at the cutting edge of research edited by Guest Editors appointed by the Editor in Chief.

The main aim of the journal is to facilitate the transfer of basic information to clinical applications and to promote an understanding of the fundamental mechanisms of neural growth, development and pathology.

Please note that of January 2020 *The International Journal of Developmental Neuroscience* will no longer be published by Elsevier.

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If

quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### *Essential title page information*

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### *Abstract*

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### *Keywords*

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or



other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### *Units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

#### *Nomenclature and units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry](#) for further information.

#### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork](#).

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

*Tables*

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

*References*

*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

*Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

*Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.



### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/international-journal-of-developmental-neuroscience>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### *Video*

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### *Data visualization*

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### *Supplementary material*

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### *Research data*

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).