

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

Jéssica Sena Gonçalves

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE E RESTRIÇÃO PROTÉICO CALÓRICA
MATERNA DURANTE A LACTAÇÃO NOS ASPECTOS NUTRICIONAIS E
COMPORTAMENTAIS DA PROLE DE RATOS WISTAR NO DESMAME E
ADOLESCÊNCIA**

Diamantina
2023

Jéssica Sena Gonçalves

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE E RESTRIÇÃO PROTÉICO CALÓRICA
MATERNA DURANTE A LACTAÇÃO NOS ASPECTOS NUTRICIONAIS E
COMPORTAMENTAIS DA PROLE DE RATOS WISTAR NO DESMAME E
ADOLESCÊNCIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a, Dr^a. Tania Regina Riul
Coorientadora: Prof^a, Dr^a. Nísia Andrade Villela
Dessimoni Pinto

**Diamantina
2023**

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

G635e Gonçalves, Jéssica Sena
2023 Efeitos do jejum intermitente e restrição protéico calórica materna durante a lactação nos aspectos nutricionais e comportamentais da prole de ratos Wistar no desmame e adolescência [manuscrito] / Jéssica Sena Gonçalves. -- Diamantina, 2023.
121 p. : il.

Orientador: Prof. Tania Regina Riul.
Coorientador: Prof. Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Diamantina, 2023.

1. Lactação. 2. Jejum intermitente. 3. Restrição proteico calórica. 4. Estado redox. 5. Comportamento. I. Riul, Tania Regina. II. Pinto, Nísia Andrade Villela Dessimoni. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-2886 e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM


Jéssica Sena Gonçalves

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE E RESTRIÇÃO PROTÉICO CALÓRICA
MATERNA DURANTE A LACTAÇÃO NOS ASPECTOS NUTRICIONAIS E
COMPORTAMENTAIS DA PROLE DE RATOS WISTAR NO DESMAME E
ADOLESCÊNCIA**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a, Dr^a. Tania Regina Riul
Coorientadora: Prof^a, Dr^a. Nísia Andrade Villela
Dessimoni Pinto


Data de Aprovação: 27/01/2023.

Documento assinado digitalmente
 PAULO DE SOUZA COSTA SOBRINHO
Data: 24/04/2023 08:32:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo de Souza Costa Sobrinho
Departamento de Nutrição- UFVJM

Documento assinado digitalmente
 ARTHUR ROCHA GOMES
Data: 20/04/2023 19:25:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Arthur Rocha Gomes
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP

Documento assinado digitalmente
 TANIA REGINA RIUL
Data: 19/04/2023 20:27:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a, Dr^a. Tania Regina Riul
Departamento de Nutrição - UFVJM

Diamantina

A minha família e amigos, pelo apoio e carinho.
A todos aqueles que não tem acesso à educação.

AGRADECIMENTOS

Há 2 anos atrás, finalizei minha graduação e hoje finalizo mais uma etapa importante em minha vida, com imensa gratidão a todos que fizeram parte dessa jornada de forma direta e indireta.

Ao meu pai pelo suporte incondicional. Através do seu trabalho duro e diário, não deixou me faltar nada durante esse tempo e com seu esforço me permitiu estudar, adquirir mais conhecimento e batalhar pelos meus objetivos.

A minha mãe pela, sabedoria, paciência e força que me transferiu nos momentos de desânimo e apreensão. Suas palavras foram essenciais para manter minha esperança de que seria possível e que dias melhores estavam por vir. Todos os seus conselhos me guiaram até aqui.

As minhas irmãs mais velhas pela companhia, convívio diário e a possibilidade de amadurecer diante dos desafios, sempre juntas.

Ao meu companheiro da vida, que me motiva a ser cada dia melhor, me alegra diariamente e me compreende.

Aos graduandos, Aline, Ana Carla, Clarice, Leonara, Nícollas e Raiana, que participaram e contribuíram na elaboração do projeto, pela dedicação e responsabilidade. Pela possibilidade de coorientá-los e dividir conhecimento.

Ao Alexandre, por abrir as portas do laboratório para mim há 6 anos atrás. Só tenho a agradecer pelos puxões de orelha, cuidados, amizade, paciência, suporte diário, boas risadas e ensinamentos que vão muito além das pesquisas.

A minha professora e orientadora Tania, pela confiança, paciência, e todos os ensinamentos acadêmicos e pessoais. Pelo exemplo de sabedoria e dedicação que é para mim. Quero ter um dia 1% da sua força.

A meus colegas do mestrado, pela oportunidade de conhecê-los mesmo que virtualmente.

Ao meu amigo Ítalo, pelas conversas, trocas de ideias, companheirismo e ajudas durante todo esse processo.

Ao Programa de Bolsas da UFVJM pela concessão de bolsa institucional durante 1 ano.

Ao PPGCN e todos os docentes que o compõe. Pela oportunidade de aprender tanto, mesmo com todos os desafios do ensino remoto.

Sem vocês nada seria possível!!

1. EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE E RESTRIÇÃO PROTÉICO CALÓRICA MATERNA DURANTE A LACTAÇÃO NOS ASPECTOS NUTRICIONAIS E COMPORTAMENTAIS DA PROLE DE RATOS WISTAR NO DESMAME E ADOLESCÊNCIA

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do jejum intermitente, restrição proteico-calórica aplicados durante a fase de lactação na prole de ratas Wistar, após o desmame e adolescência. Foram utilizadas 24 ninhadas composta por 1 rata-mãe e 8 filhotes (6 machos e 2 fêmeas) de ratos da linhagem Wistar recém-nascidos, distribuídos aleatoriamente em três grupos: Controle (C) – as mães receberam dieta comercial e água *ad libitum* (n=8); Jejum Intermitente (J) – as mães receberam dieta comercial *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação e água *ad libitum* (n=8); Restrição Proteico-Calórica (R) – as mães receberam 50% da dieta comercial consumida pelas ratas C e água *ad libitum* (n=8). Após o desmame 2 filhotes machos de cada grupo foram anestesiados para avaliação do comprimento naso-anal (CNA) e eutanasiados por exsanguinação. Os demais filhotes machos e 2 fêmeas de cada grupo receberam ração comercial e água *ad libitum* e testados a partir do 49º dia no Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto, Reconhecimento de objetos, Transição Claro-Escuro. No 53º dia foi medido CNA dos animais, que foram eutanasiados por decapitação para retirada de 5 mL de sangue para análise bioquímica do colesterol total, triacilglicerol, *High Density lipoprotein* (HDL), glicose, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), creatinina e bilirrubina, retirada dos órgãos (baço, coração, fígado, rins, suprarrenais, e testículos), ossos (fêmur, tibia) e gordura abdominal (mesentérica, retroperitoneal, visceral e dos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas) para pesagem/medida e avaliação do estado redox na amígdala e hipotálamo. Os dados foram submetidos à ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls quando apropriado ($p < 0,05$). J e R apresentaram no 21º dia menor peso corporal, CNA e IMC. No 53º dia, apresentaram menor ingestão de ração, calorias, água, peso inicial e final, CNA, peso do coração, fígado, gordura abdominal e rins, maior coeficiente de eficiência energética. O J reduziu a glicose sérica e aumentou triglicerídeos e o R reduziu o teor de minerais totais; R entraram e permaneceram menos tempo no centro do CA. O R aumentou a enzima superóxido dismutase na amígdala e hipotálamo. Os animais J apresentaram maior percentual de entradas

e de tempo, frequência de falsas entradas e frequência de idas a ponta dos braços abertos comparado ao C e R. Não foram encontradas diferenças estatísticas no TRO. O Jejum intermitente e a Restrição Proteico-Calórica materna na lactação causaram desnutrição, prejuízo no crescimento e desenvolvimento. A R aumentou a ansiedade e os J reduziu a ansiedade e/ou aumentou a impulsividade.

Palavras-chave: amamentação; desnutrição; comportamento; estado redox.

1. EFFECTS OF INTERMITTENT FASTING AND MATERNAL PROTEIN CALORIC RESTRICTION DURING LACTATION ON THE NUTRITIONAL AND BEHAVIORAL ASPECTS OF WISTAR RATS OFFSPRING IN WEANING AND ADOLESCENCE

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effects of intermittent fasting, protein-calorie restriction applied during the lactation phase in the offspring of Wistar rats, after weaning and adolescence. 24 litters were used, consisting of 1 mother rat and 8 pups (6 males and 2 females) of newborn Wistar rats, randomly distributed into three groups: Control (C) - mothers received commercial diet and water ad libitum (n=8); Intermittent Fasting (J) – mothers received a commercial diet ad libitum in the first 24 hours after birth and had no access to food for the next 24 hours, alternating periods of diet offer and restriction every 24 hours throughout lactation and water ad libitum (n=8); Protein-Caloric Restriction (R) – the mothers received 50% of the commercial diet consumed by the C rats and water ad libitum (n=8). After weaning, 2 male pups from each group were anesthetized to assess the naso-anal length (NAC) and euthanized by exsanguination. The other male and 2 female pups from each group received commercial chow and water ad libitum and tested from the 49th day on in the Labyrinth in Cruz Elevado, Open Field, Object Recognition, Light-Dark Transition. On the 53rd day, the ANC of the animals was measured, which were euthanized by decapitation to remove 5 mL of blood for biochemical analysis of total cholesterol, triacylglycerol, High Density Lipoprotein (HDL), glucose, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), creatinine and bilirubin, removal of organs (spleen, heart, liver, kidneys, adrenals, and testes), bones (femur, tibia) and abdominal fat (mesenteric, retroperitoneal, visceral and reproductive organs of males and females) for weighing/ measurement and evaluation of the redox state in the amygdala and hypothalamus. Data were submitted to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test when appropriate ($p < 0.05$). J and R had lower body weight, ANC and BMI on the 21st day. On the 53rd day, they had lower intake of feed, calories, water, initial and final weight, ANC, weight of the heart, liver, abdominal fat and kidneys, higher coefficient of energy efficiency. J reduced serum glucose and increased triglycerides and R reduced total mineral content; R entered and remained less time in the center of the CA. The R increased the enzyme superoxide dismutase in the amygdala and hypothalamus. The J animals had a higher percentage of entries and time, frequency of false entries and frequency of trips to the tip of the open arms compared to C and R. No statistical differences were found in TRO. Intermittent fasting and maternal protein-

caloric restriction during lactation caused malnutrition, impaired growth and development. The R increased anxiety and the J reduced anxiety and/or increased impulsivity.

Keywords: breast-feeding; malnutrition; behavior; redox state.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERÊNCIAS	16
ARTIGO 1 - O JEJUM INTERMITENTE E A RESTRIÇÃO PROTEICO - CALÓRICA DURANTE A LACTAÇÃO PREJUDICAM O CRESCIMENTO DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DA PROGÊNIE DE RATAS WISTAR	19
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 METODOLOGIA	23
2.1 Princípios Éticos	23
2.2 Animais e desenho experimental	23
2.3 Avaliação dos filhotes aos 21 dias	23
2.4 Avaliação dos filhotes aos 53 dias	24
2.5 Avaliação nutricional	24
2.6 Avaliação comportamental	24
2.6.1 Campo aberto	24
2.6.2 Teste de transição claro-escuro	25
2.7 Eutanásia e análises bioquímicas	25
2.8 Avaliação dos órgãos e gordura abdominal	25
2.9 Avaliação dos minerais totais	26
2.10 Análise estatística	26
3 RESULTADOS	26
3.1 Avaliação nutricional dos filhotes aos 21 dias	26
3.2 Avaliações dos filhotes aos 53 dias	27
3.2.1 Avaliação nutricional	27
3.2.2 Avaliação dos órgãos e gordura abdominal	30
3.2.3 Análises bioquímicas	31
3.3 Avaliação Comportamental	33
3.3.1 Campo aberto	33
3.3.2 Teste de transição claro – escuro	35
4 DISCUSSÃO	35

5 CONCLUSÕES	38
6 REFERÊNCIAS	39
ARTIGO 2 - DIETA RESTRITIVA MATERNA CAUSA ANSIEDADE E ALTERA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NA AMIGDALA E HIPOTÁLAMO DA PROGÊNIE ADOLESCENTE DE RATAS WISTAR.....	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 METODOLOGIA	50
2.1 Princípios Éticos	50
2.2 Animais e desenho experimental	51
2.3 Avaliação nutricional	51
2.4 Avaliação comportamental	51
2.4.1 Labirinto em cruz elevado	52
2.4.2 Teste de reconhecimento de objetos	53
2.5 Eutanásia e coleta de amostras biológicas	53
2.5.1 Estado Redox	53
2.5.1.1 Superóxido dismutase	54
2.5.1.2 Capacidade de redução férrica do plasma	54
2.5.1.3 Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico	54
2.6 Tecido adiposo abdominal	54
2.7 Análise estatística	55
3 RESULTADOS	55
3.1 Avaliação Nutricional	55
3.2 Avaliação comportamental	56
3.2.1 Labirinto em cruz elevado.....	56
3.2.2 Teste de reconhecimento de objetos.	60
3.3 Estado Redox	62
4 DISCUSSÃO	63
5 CONCLUSÕES	68
6 REFERÊNCIAS	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA PHYSIOLOGY AND BEHAVIOR 81

ANEXO B - NORMAS DA REVISTA BEHAVIOR BRAIN RESEARCH 103

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a população, principalmente o público feminino, busca adequar-se a um padrão de beleza, a fim de manter-se magro seguindo imposições estéticas, sociais[1] e veiculadas pela mídia, que influenciam os processos alimentares e que podem levar a distúrbios alimentares e de imagem corporal[2].

Durante a gestação, as mulheres reavaliam sua imagem corporal à medida que ocorrem as mudanças no tamanho e na forma do seu corpo. Neste período, ocorre o distanciamento das mulheres do “corpo ideal”, devido as rápidas mudanças que ocorrem, podendo ocasionar um sentimento de insatisfação com o corpo e com sua imagem[3]. Além disso, cerca de 40% das mulheres eutróficas e 60% com sobrepeso, têm ganho de peso excessivo durante a gestação[4]. Desta forma, após o parto, estas mulheres podem recorrer a estratégias de emagrecimento severas, através de práticas inadequadas de alimentação[5] para obterem a forma física pré-gestacional.

Estudos demonstram que a amamentação traz benefícios para a mãe[6] e para o bebê [7,8]. Sendo crucial para o bebê, pois fornece os nutrientes necessários para desenvolvimento corporal, fisiológico e de estruturas neurológicas[9]. Para isso, a mãe deve priorizar uma alimentação saudável[10]. Entretanto, quando a alimentação materna está inadequada, a qualidade e a composição do leite serão comprometidas, interferindo nos níveis de compostos bioativos que serão fornecidos a criança[11]. Diante disto, mulheres em fase de lactação que realizam dietas restritivas, como o jejum intermitente e a restrição calórica, podem causar prejuízos ao desenvolvimento do filho.

O jejum intermitente atualmente está se destacando como prática de controle alimentar[12], e segundo alguns autores, é uma modalidade de intervenção nutricional, definida como a ausência da ingestão de alimentos e líquidos calóricos, em que o indivíduo permanece em jejum durante o dia e volta a se alimentar a noite, por um período de tempo [13,14,15]. Entretanto, o período de privação pode variar de 16 [16] a 48 horas[17].

Estudos mostram que o jejum intermitente além de ocasionar a perda de peso, reduz os riscos de doenças cardiometabólicas [18,19] regula os marcadores inflamatórios, reduz a glicose de jejum, melhora o colesterol HDL e LDL, além de diminuir os riscos de desenvolvimento do câncer[19]. Entretanto, pode ocasionar danos à saúde quando utilizado a longo prazo[20].

Dentre as teorias mais utilizadas para controle de peso, destaca-se a restrição proteico-calórica [21] caracterizada pela redução na quantidade de alimentos, fornecendo macronutrientes e micronutrientes, entretanto em proporções insuficientes [22].

A restrição proteico-calórica é conhecida por trazer benefícios elevando a longevidade e reduzindo as doenças crônicas não transmissíveis [21]. Porém, estudos que avaliaram seus efeitos em roedores no início da vida, demonstraram alterações na neurogênese e aprendizado espacial [23], ansiedade [22, 24], locomoção, exploração [25] e memória [26]. Desta forma, indicando que a restrição interferiu no desenvolvimento cognitivo e comportamental dos animais. Frente as informações, ainda são escassos estudos que avaliaram os efeitos do jejum intermitente nas fases iniciais da vida, reforçando a necessidade de identificar os possíveis prejuízos que podem ser causados pela inserção precoce de tais dietas.

Dentro do contexto apresentado, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos promovidos na prole pelo jejum intermitente e restrição proteico-calórica materna durante a lactação em ratos Wistar adolescentes.

Assim, a presente dissertação foi subdividida em dois artigos:

O primeiro artigo intitulado “O jejum intermitente e a restrição proteico-calórica durante a lactação prejudicam o crescimento desenvolvimento e comportamento da progênie de ratas wistar”, será enviado à revista *Physiology & Behavior* e será dado enfoque nas avaliações nutricionais (desmame e final da adolescência), parâmetros bioquímicos e avaliação da locomoção e exploração da prole (final da adolescência).

O segundo artigo intitulado “Dieta restritiva materna causa ansiedade e altera a capacidade antioxidante na amígdala e hipotálamo da progênie adolescente de ratas wistar” será enviado a revista *Behavioural Brain Research* e será dado enfoque as análises do estado redox para a região da amígdala e hipotálamo, bem como a avaliação da memória de objetos de longo prazo e de comportamentos semelhantes a ansiedade na prole

2 REFERÊNCIAS

- [1] Silva GA, Lange ESN. Imagem corporal: a percepção do conceito em indivíduos obesos de sexo feminino. *Psicol. Argum.* 2010; 28(60): 43-54.
- [2] Floriano RS, Mazur CE, Schwarz K, Benincá SC, Machado TWM. Dietas para emagrecimento publicadas em uma magazine direcionado ao público feminino: análise do conteúdo nutricional. *Sci med.* 2016; 26(2):ID22663.
- [3] Meireles JFF, Neves CM, Carvalho PHB, Ferreira MEC. Satisfação corporal, idade gestacional e estado nutricional em gestantes. *ABCS Health Sci.* 2016; 41(1):23-28.
- [4] Chu SY, Callaghan WM, Bish CL, D'Angelo D. Gestational weight gain by body mass index among us women delivering live births, 2004-2005: fueling future obesity. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 200:271.e1-271.e7.
- [5] Witt JSGZ, Schneider AP. Nutrição estética: valorização do corpo e da beleza através do cuidado nutricional. *Ciências&Saúde Coletiva* 2011;16(9):3909-16.
- [6] Chowdhury R, Sinha B, Sankar M, Taneja S, Bhandari N, Rollins N, et al. Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica* 2015; 104: 96-113.
- [7] Horta BL, Mola CL, Victora CG. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica* 2015; 104:30-37.
- [8] Boccolini CS, Carvalho ML, Oliveira MIC, Perez-escamilla R. Breastfeeding during the first hour of life and neonatal mortality. *J Pediatr* 2013; 89(2):131-136.
- [9] Antunes LS, Antunes LAA, Corvino MPF, Maia LC. Amamentação natural como fonte de prevenção em saúde. *Ciências&Saúde Coletiva* 2008; 13(1):103-109.
- [10] Guiné RPF, Gomes AL. A Nutrição na lactação humana. *Millenium* 2015; 49:131-152.
- [11] Goran MI, Martin AA, Alderete TL, Fujiwara H, Fields DA. Fructose in breast milk is positively associated with infant body composition at 6 months of age. *Nutrients* 2017; 9(2):146.
- [12] Moraes RCM. Impactos de uma estratégia de jejum intermitente associada a treinamento *endurance* na composição corporal e desempenho físico de ratos wistar. Uberaba. Dissertação[Mestrado em Esporte e exercício] – Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2016.

- [13] Nazatto MFS, Takahashi AS, Silva BL, Ferraz RN. Comparação entre os efeitos da dieta Low carb e do jejum intermitente no processo de emagrecimento: síntese de evidências. *International Journal of Health Management Riview* 2020; 6(1):1-9.
- [14] Santos AKM, Pinheiro ARPM, Brito CL, Galvão FGR, Macêdo FIF, Beserra TL, et al. Consequências do jejum intermitente sobre as alterações na composição corporal: uma revisão integrativa. *Rev. e-ciência* 2017; 5(1):29-37.
- [15] Santos TMC. Efeito do jejum noturno e do jejum diurno na oxidação de gorduras durante e exercício aeróbio. Dissertação[Mestrado em exercício e saúde]- Universidade de Évora; 2018.
- [16] Tinsley GM, LaBounty PM. Effects of intermitente fasting on body composition and clinical health markers in humans. *NutritionReviews* 2015;73(10):661–674.
- [17] Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermitente fasting on health and disease processes. *Ageing Research Reviews* 2017; 39:46–58.
- [18] Horne BD, Muhlestein JB, Anderson JL. Health effects of intermitente fasting: hormesis or harm? A systematic review. *Am J Clin Nutr* 2015; 102:464-470.
- [19] Patterson RE, Sears DD. Metabolic Effects of intermittent fasting. *Annu. Rev. Nutr.*2017; 37:371-393.
- [20] Chamorro ALJ, Fujii BK, Bacha EM, Lins GCV, Yamakawa KR, Bento LMA, et al. Os efeitos do jejum intermitente nos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar. *Ensaio e Ciênc.*2019; 23(3): 238-243.
- [21] Benetti F, Wegner E, Volkweis DSH, Soder TF. Restrição calórica x Longevidade: Bases científicas para uma vida longa e saudável. *Caçador* 2016; 5(1): 113-125.
- [22] Gomes AR. Efedrina altera a ansiedade e locomoção de ratos wistar tratados desde a lactação com dietas de cafeteria ou restrição calórica. Dissertação[Mestrado em Ciências Farmacêuticas]- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2016.
- [23] Cardoso A, Marrana F, Andrade JP. Caloric restriction in young rats disturbs hippocampal neurogenesis and spatial learning. *Neurobiology of learning and memory* 2016; 133:214-224.
- [24] Riul TR, Almeida SS. Feed restriction since lactation has reduced anxiety in adult Wistar rats, *Rev Nutr.* 2020; 33 (13).
- [25] Kumon M, Yamamoto K, Takahashi A, Wada K, Wada E, Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice. *Neurochemistry International* 2010; 57(1) 43–50.

[26] Braga NN, Fukuda MTH, Almeida SS, Early postnatal protein malnutrition impairs recognition memory in rats (*Rattus norvegicus*), *Psychology & Neuroscience* 2014; 7 (2): 103 – 111.

ARTIGO 1 - O JEJUM INTERMITENTE E A RESTRIÇÃO PROTEICO-CALÓRICA DURANTE A LACTAÇÃO PREJUDICAM O CRESCIMENTO DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DA PROGÊNIE DE RATAS WISTAR

Jéssica Sena Gonçalves^{ab}; Aline Cândida Ferreira^b; Ana Carla Silva Rocha^b; Clarice Ribeiro dos Santos^b; Leonara Teixeira Alves^b; Nícollas Costa Veloso^b; Raiana Lage Coimbra^b; Arthur Rocha Gomes^b; Alexandre Alves da Silva^b; Nisia Vilela Dessimoni Pinto^a, Tania Regina Riul^{ab1}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências da Nutrição- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus JK – Rodovia MGT, 367km 583, n° 5000, Alto do Jacuba – Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

^bLaboratório de Nutrição Experimental- Departamento de Nutrição - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus JK – Rodovia MGT, 367km 583, n° 5000, Alto do Jacuba – Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

¹ Autor de correspondência: Tania Regina Riul, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus JK – Rodovia MGT, 367km 583, n° 5000 – Alto do Jacuba – Diamantina, Minas Gerais, Brasil. E-mail: taniriul@yahoo.com.br

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar os filhotes (machos e fêmeas) pós-desmame de ratas Wistar submetidas ao jejum intermitente e a restrição proteico-calórica durante a lactação. Foram utilizadas 24 ninhadas compostas por uma rata-mãe e 8 filhotes (6 machos e 2 fêmeas) dividida em três grupos: Controle (C) – alimentadas com ração *ad libitum* (n=8); Jejum Intermitente (J) – alimentadas com ração *ad libitum* por 24 horas e nas próximas 24 horas ficavam sem acesso ao alimento, alternando entre oferta e restrição a cada 24 horas durante toda lactação (n=8) e Restrição Proteico-Calórica (R) – que receberam 50% da ração consumida por C (n=8). No 21º dia, 2 machos de cada ninhada foram pesados, medido o Comprimento Naso-Anal (CNA) para o índice de massa corporal (IMC). Os demais receberam ração *ad libitum* por 32 dias, foram testados no Campo aberto (CA) e transição claro-escuro (TCE), anestesiados para avaliação do CNA e eutanasiados para a retirada de sangue, pesagem dos órgãos, gordura abdominal e ossos. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Newman-Keuls, quando apropriado ($p < 0,05$). J e R apresentaram no 21º dia menor, peso corporal, CNA e IMC. No 53º dia, apresentaram menor ingestão de ração, calorias, água, peso inicial e final, CNA, peso do coração, fígado, gordura abdominal e rins, maior coeficiente de eficiência energética. O J reduziu a glicose sérica e aumentou triglicerídeos; R entraram e permaneceram menos tempo no centro do CA. As dietas restritivas na lactação causaram desnutrição, prejuízo no crescimento e desenvolvimento e a R aumentou a ansiedade.

Palavras-chave: Desnutrição; pós-natal; dieta restritiva; Campo Aberto; comportamento.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the offspring (males and females) after weaning of female Wistar rats submitted to intermittent fasting and protein-caloric restriction during lactation. 24 litters composed of a mother rat and 8 pups (6 males and 2 females) were divided into three groups: Control (C) – fed with ration ad libitum (n=8); Intermittent Fasting (J) – fed with ration ad libitum for 24 hours and in the next 24 hours they had no access to food, alternating between supply and restriction every 24 hours throughout lactation (n=8) and Protein-Caloric Restriction (R) – who received 50% of the ration consumed by C (n=8). On the 21st day, 2 males from each litter were weighed, measuring Naso-Anal Length (NAL) for body mass index (BMI). The others received ration ad libitum for 32 days, were tested in the Open Field (CA) and light-dark transition (TCE), anesthetized for ANC evaluation and euthanized for blood withdrawal, weighing of organs, abdominal fat and bones. Data were submitted to ANOVA and Newman-Keuls test, when appropriate ($p < 0.05$). J and R presented lower body weight, ANC and BMI on the 21st day. On the 53rd day, they had lower intake of feed, calories, water, initial and final weight, ANC, weight of the heart, liver, abdominal fat and kidneys, higher coefficient of energy efficiency. J reduced serum glucose and increased triglycerides; R entered and remained less time in the center of the CA. Restrictive diets during lactation caused malnutrition, impaired growth and development, and R increased anxiety.

Keywords: Malnutrition; postnatal; restrictive diet; Open field; behavior.

1 INTRODUÇÃO

As fases iniciais da vida são importantes devido a vulnerabilidade deste período, considerado crítico, por estar associado aos intensos processos de formação, diferenciação e maturação das células e tecidos do corpo [1,2,3].

Em especial, a lactação desempenha um papel decisivo na determinação da saúde [2], pois nessa fase, a prole depende exclusivamente da mãe para receber o aporte nutricional, uma vez que o leite materno possui todos os nutrientes essenciais para suprir as necessidades nutricionais da criança durante os primeiros meses de vida, garantindo assim o crescimento e desenvolvimento adequados [4,5].

Entretanto, a má nutrição materna durante a lactação pode alterar a composição do leite, gerando impactos negativos de longo prazo na prole [6,7,8], sendo em alguns casos, irreversíveis [2,9] mesmo com a recuperação nutricional dos filhotes.

Estudos mostram que as mulheres são altamente sensíveis a imagem corporal e a preocupações alimentares, inclusive no período pós-parto [10]. Esse período, em particular, tem sido reportado como um momento em que as mulheres passam por altos níveis de pressão para perder rapidamente o peso adquirido durante a gestação e se adequarem aos padrões de beleza de forma corporal magra [11].

A consequente insatisfação com a forma e medidas corporais contribuem para a adoção de práticas alimentares inadequadas, como restrições alimentares rigorosas e dietas da moda, como o jejum intermitente, no intuito de acelerar a perda de peso [12], motivadas pelo padrão de beleza imposto pela sociedade ocidental atual e fortemente reafirmado pelas mídias [11, 13].

Estudos utilizando roedores mostram que a restrição proteico-calórica materna na fase de lactação prejudicou o crescimento e comportamento dos filhotes na idade adulta [3,14,15]. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do jejum intermitente, sendo necessário a realização de estudos sobre esta prática durante este período. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos nutricionais (desmame e final da adolescência), fisiológicos, bioquímicos e comportamentais utilizando o teste de campo aberto (CA) e transição claro-escuro (TCE) (final da adolescência), em filhotes machos e fêmeas de ratas Wistar, frente aos efeitos do jejum intermitente e restrição proteico-calórica aplicados as mães durante a lactação.

2 METODOLOGIA

2.1 Princípios Éticos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental (LabNutrex), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e teve início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFVJM) parecer n° 055/2019. Os ratos foram manejados e eutanasiados de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que estão de acordo com o National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications N°. 80-23).

Os animais foram alojados individualmente em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), acondicionadas em estantes ventiladas (Alesco[®]), sob condições padrões (umidade natural, temperatura de 22 ± 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com início do claro as 6 a.m.). As caixas forradas com maravalha autoclavada foram trocadas e limpas semanalmente.

2.2 Animais e desenho experimental

Foram utilizados 135 filhotes (90 machos e 45 fêmeas) de ratos Wistar recém desmamados oriundos de ninhadas compostas por uma rata mãe e 8 filhotes (6 machos e 2 fêmeas):

- **Controle (C)** - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital[®]) e água *ad libitum* durante a lactação (n=8 ninhadas).
- **Jejum Intermitente (J)** - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital[®]) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação e água *ad libitum* (n=8 ninhadas).
- **Restrição proteico-calórica (R)** - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida pelas fêmeas do grupo C e água *ad libitum* durante a lactação (n=8 ninhadas).

2.3 Avaliação dos filhotes aos 21 dias

No desmame (21° dia), 48 filhotes machos, sendo 2 de cada ninhada, foram eutanasiados por decapitação para as avaliações nutricionais ao desmame.

2.4 Avaliação dos filhotes aos 53 dias

Após o desmame, 87 filhotes (42 machos e 45 fêmeas) foram alimentados com ração comercial Nuvilab (Nuvital[®]) e água *ad libitum* e alojados individualmente nas caixas durante 32 dias para as avaliações nutricionais e comportamentais no pós-desmame.

2.5 Avaliação nutricional

A ingestão de ração e água dos animais na pós-lactação (21° ao 53° dia), foram contabilizadas sendo pesadas/medidas (entre 8:00 e 10:00 a.m.), subtraindo-se a oferta pelo resto encontrado no dia seguinte. E os animais foram pesados individualmente a partir do desmame uma vez por semana em balança semianalítica (Bel[®]), com estes dados foram calculados a ingestão total de ração, água e calorias (por meio da multiplicação das quantidades totais ingeridas de carboidratos, lipídios e proteínas pelos fatores 4, 9 e 4, respectivamente) e ganho de peso (através da subtração do peso no 53° dia pelo peso no 21° dia). Através dos dados de ganho de peso e calorias ingeridas foi calculado o coeficiente de eficiência energética (CEE= ganho de peso / ingestão energética).

Através do comprimento nasoanal (CNA), obtido no dia da eutanásia medindo-se, com auxílio da fita métrica, a distância da ponta do focinho até a base da cauda dos animais, foi calculado o índice de massa corporal ($IMC = \text{peso corporal} / \text{CNA}^2$).

2.6 Avaliação comportamental

No 50° dia de vida foi realizado o teste no campo aberto e no 52° dia o teste de transição claro-escuro. Todos os testes comportamentais foram realizados na sala de comportamento do LabNutrex. A sala conta com a presença de um exaustor e lâmpada fluorescente (iluminação de 130 lux). Os procedimentos descritos foram realizados pela manhã (07:00 às 12:00 p.m.), em duplo cego, com a realização de filmagens por uma câmera (Sony[®] Handycam), para posterior análise.

2.6.1 Campo aberto (CA)

O equipamento consiste em uma arena retangular de madeira (70 cm x 70 cm x 50 cm), com as paredes laterais e o piso na cor cinza claro, contendo marcações de 16 quadrados (cada qual com 17,5 x 17,5 cm). O campo aberto é utilizado para avaliar a atividade locomotora/exploratória, através da área percorrida pelos animais, que pode ser medida pela

contagem dos quadrados atravessados. O teste também é utilizado para avaliar a ansiedade uma vez que os ratos são expostos a um ambiente aberto e novo [16].

Cada animal foi colocado no centro da arena e filmado durante 5 minutos. As variáveis observadas foram: latência de primeira saída do centro, frequência de entradas e tempo gasto no centro, frequência de quadrados atravessados e frequência de levantar-se sob as patas traseiras (exploração vertical). Ao término de cada teste, a arena foi limpa com etanol 70%.

2.6.2 Teste de transição claro-escuro (TCE)

O teste de transição claro-escuro se baseia no conflito do roedor entre a exploração a um ambiente novo e a aversão a arena clara e iluminada [17]. O aparato consiste em uma caixa retangular constituída de dois compartimentos quadrados (40 x 40 x 40 cm). O compartimento claro é caracterizado por possuir as paredes e o assoalho na cor branca, além de uma lâmpada branca em sua lateral (160 lux). O compartimento escuro tem as paredes e o assoalho na cor preta, com uma lâmpada de luz vermelha em sua lateral (20 lux). Os dois compartimentos são conectados por uma abertura retangular com altura de 10 cm no centro da parede divisória.

Cada animal foi colocado na zona clara com a cabeça voltada para a abertura que conecta os dois compartimentos, sendo seus movimentos filmados por 5 minutos. Foram avaliados: a latência para a primeira entrada no compartimento escuro, frequência de entradas (F) e o tempo (T) de permanência nos compartimentos claro (C) e escuro (E), além da frequência de falsas entradas no lado claro (FFC) e a frequência de *head poke* (HP) [18]. Entre cada animal testado, o aparato era limpo com etanol 70%.

2.7 Eutanásia e análises bioquímicas

No 53º dia os animais foram colocados em jejum por 12 horas e, no dia seguinte, no momento da eutanásia por decapitação, cerca de 5mL de sangue foi coletado a partir do tronco, colocado em banho maria, centrifugado e separado o soro que foi armazenado em eppendorf, no ultra freezer (-80°C). Posteriormente, foram avaliados os teores de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL; *high density lipoprotein*), triacilglicerol, bilirrubina, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) por ensaio enzimático-colorimétrico, seguindo a padronização do fabricante dos kits (Labtest®).

2.8 Avaliação dos órgãos e gordura abdominal

Após a eutanásia, os órgãos (baço, coração, fígado, rins, suprarrenais e testículos dos machos) e a gordura abdominal (mesentérica, retroperitoneal, visceral e dos órgãos

reprodutivos de machos e fêmeas) foram retirados, mantidos em solução fisiológica, secos em papel filtro e pesados em balança analítica (Shimadzu®). Com esses dados calculou-se o peso relativo dos órgãos e gordura abdominal (peso do órgão ou gordura/peso corporal x 100).

2.9 Avaliação dos minerais totais

As patas esquerdas foram retiradas e armazenadas em tubo falcon, no freezer (-20 °C) para posteriormente serem limpas e os ossos (fêmur e tíbia) incinerados em forno mufla a 550°C [19]. As cinzas foram pesadas em balança analítica (Shimadzu®) para o cálculo de minerais totais (peso das cinzas/peso dos ossos x 100).

2.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Statistica®, versão 10.0. Os gráficos foram elaborados com o auxílio do GraphPad Prism®, versão 7.0. Após verificação da normalidade (Skewness) os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Newman-Keuls, quando apropriado. Os dados foram analisados usando a ANOVA de duas vias, com os fatores dieta (C, J e R) e sexo (machos e fêmeas) e ANOVA para medidas repetidas para o fator dias (21, 28, 35,42 e 49 dias). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação nutricional dos filhotes aos 21 dias

No desmame, os animais J e R apresentaram menores valores no peso corporal (Fig. 1A; $F_{(2, 45)} = 250,44$, $p < 0,0001$), CNA (Fig. 1B; $F_{(2, 45)} = 168,81$, $p < 0,0001$) e IMC (Fig. 1C; $F_{(2, 45)} = 59,61$, $p < 0,0001$) do que os C.

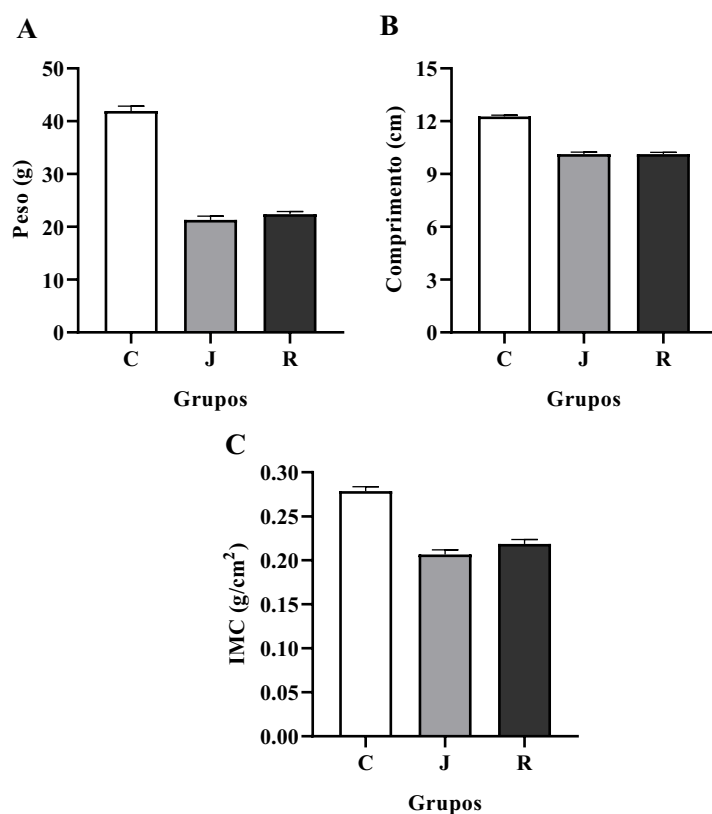


Fig. 1. Peso corporal (A), CNA (B) e IMC (C) dos filhotes machos no desmame (21° de vida). Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 16 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 16 machos).

3.2 Avaliações dos filhotes aos 53 dias

3.2.1 Avaliação nutricional

Os animais J e R apresentaram menores valores de ingestão de ração, calorias (Fig. 2A e 2B; $F_{(2, 81)} = 28,80$, $p < 0,0001$) e água (Fig. 2C; $F_{(2, 81)} = 36,39$, $p < 0,0001$) e maiores valores de CEE (Fig. 2D; $F_{(2, 81)} = 23,20$, $p < 0,0001$) comparados aos C.

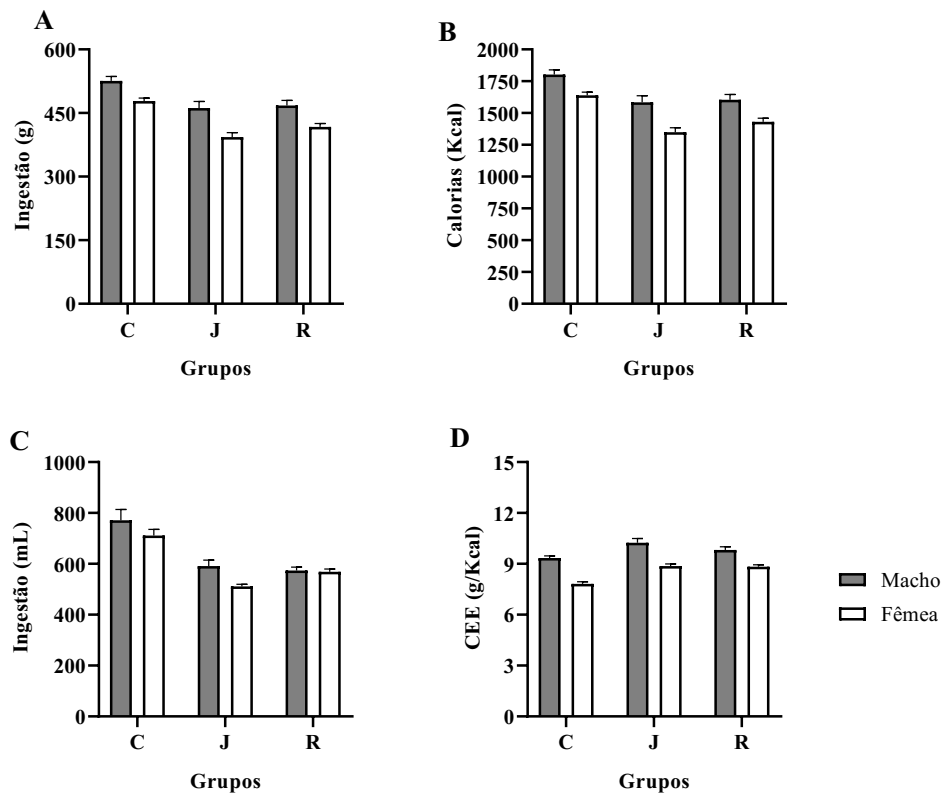


Fig. 2. Ingestão de ração (A), calorias (B), água (C) e CEE (D) dos animais pós-lactação (53^o dia). Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

Os machos apresentaram maiores valores de ingestão de ração, calorias (Fig.2A e 2B $F_{(1, 81)} = 41,75$ $p < 0,0001$), água (Fig. 2C; $F_{(1, 81)} = 5,62$ $p < 0,05$) e CEE (Fig.2D ; $F_{(1, 81)} = 110,74$ $p < 0,0001$) comparados as fêmeas.

Os animais J e R apresentaram menores valores de peso corporal inicial (Fig. 3A; $F_{(2, 81)} = 397,35$, $p < 0,0001$), ganho de peso (Fig. 3B; $F_{(2, 81)} = 4,15$, $p < 0,05$), CNA (Fig. 3C; $F_{(2, 65)} = 14,12$, $p < 0,0001$) e peso corporal ao longo do tempo (Fig. 3E e 3F; $F_{(2, 81)} = 106,32$, $p < 0,0001$) comparados aos C.

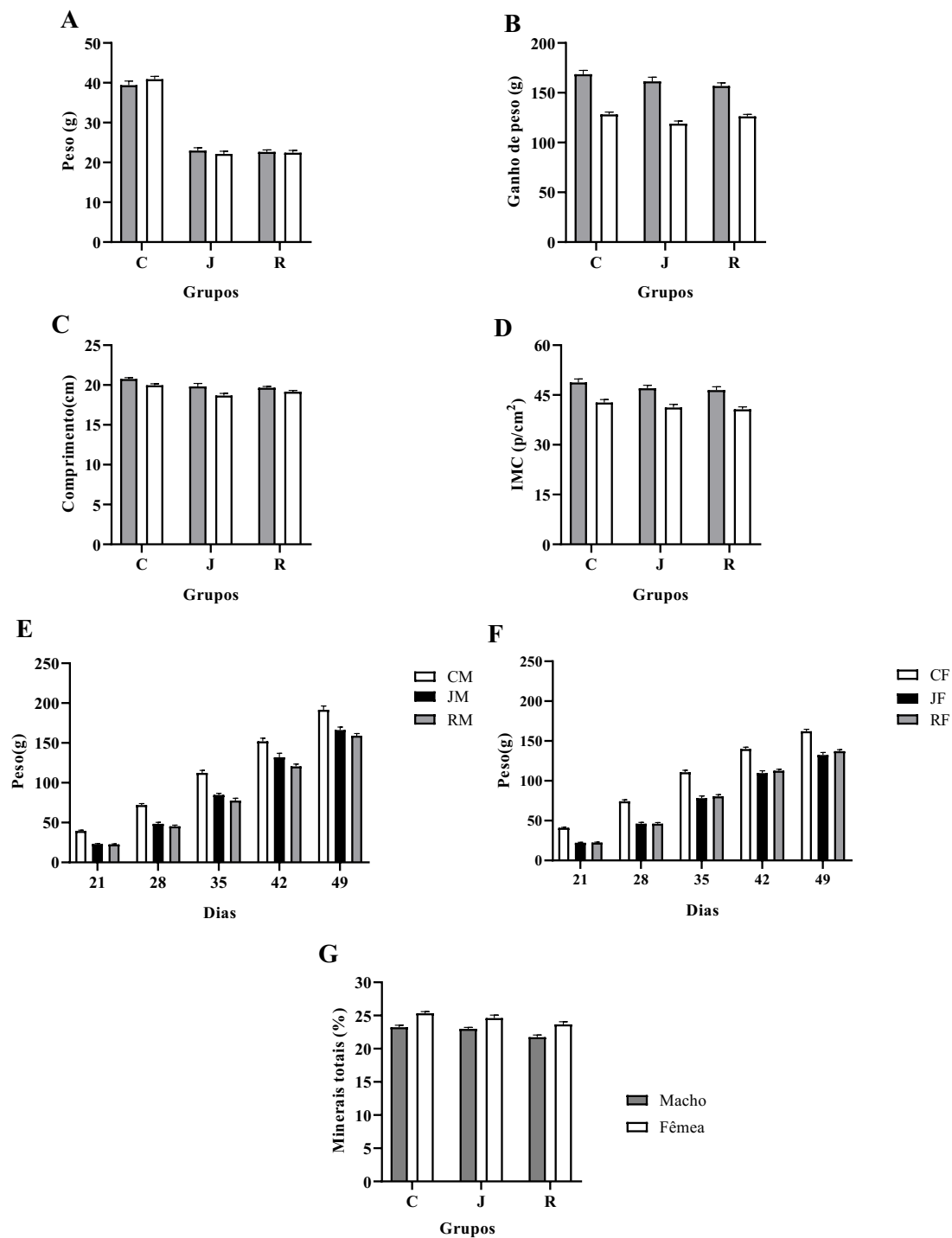


Fig. 3. Peso corporal inicial (A), ganho de peso (B), CNA (C), IMC (D), peso ao longo do tempo de machos (E) e fêmeas (F) e minerais totais (G) dos animais na pós-lactação. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); M – filhotes machos; F – filhotes fêmeas.

Os machos apresentaram maiores valores de peso corporal ao longo do tempo (Fig. 3E e 3F; $F_{(1, 81)}=24,41$ $p < 0,0001$), ganho de peso (Fig. 3B; $F_{(1, 81)}= 223,62$ $p < 0,0001$), CNA (Fig.3C; $F_{(1, 65)}=19,14$ $p < 0,0001$) e IMC (Fig.3D; $F_{(1, 65)}= 58,85$ $p < 0,0001$) comparados as fêmeas.

O peso corporal dos animais aumentou gradativamente ao longo dos dias (Fig. 3E e 3F; $F_{(4, 324)}= 7508,89$ $p < 0,0001$). Foi demonstrado efeito de interação dieta e dias ($F_{(8, 324)}= 9,39$ $p < 0,0001$); dieta, sexo e dias ($F_{(8, 324)}= 2,23$ $p < 0,05$); sexo e dias ($F_{(4, 324)}= 106,10$ $p < 0,0001$). Os grupos J e R demonstraram peso corporal menor que os C todos os dias, os machos pesaram mais que as fêmeas no 42° e 49° dia, e os machos do grupo J pesaram mais que os R aos 42 dias.

Ao avaliar os minerais totais (%), os animais R apresentaram menores valores ($F_{(2, 64)}= 12,04$, $p < 0,0001$) comparados aos C e J e as fêmeas maiores ($F_{(1, 64)}= 47,74$, $p < 0,0001$) (Fig. 3G) do que os machos.

3.2.2 Avaliação dos órgãos e gordura abdominal

Os animais J e R apresentaram menores valores de peso absoluto do baço ($F_{(2, 64)}= 7,87$, $p < 0,001$), coração ($F_{(2, 64)}= 41,11$, $p < 0,0001$), fígado ($F_{(2, 64)}= 10,50$, $p < 0,0005$), gordura abdominal ($F_{(2, 64)}= 28,19$, $p < 0,0001$), rins ($F_{(2, 134)}= 39,53$, $p < 0,0001$) e testículos ($F_{(2, 65)}= 21,42$, $p < 0,0001$) em relação aos C (Tabela 1).

Tabela 1. Peso absoluto dos órgãos e gordura abdominal dos animais pós-lactação (53° dia).

Órgãos/Gordura (g)	C		J		R	
	M	F	M	F	M	F
Baço	0,71 ± 0,03	0,51 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,47 ± 0,02
Coração	0,75 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,53 ± 0,01
Fígado	8,69 ± 0,20	7,23 ± 0,16	7,93 ± 0,23	6,33 ± 0,10	7,92 ± 0,28	6,43 ± 0,22
Suprarrenais	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,001
Rins	0,91 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,80 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,79 ± 0,02	0,65 ± 0,01
Testículos	1,24 ± 0,03	-	1,05 ± 0,01	-	1,04 ± 0,02	-
Gordura	6,95 ± 0,29	6,30 ± 0,34	5,34 ± 0,38	4,56 ± 0,27	5,06 ± 0,18	4,58 ± 0,13

Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); M – filhotes machos; F – filhotes fêmeas.

Os machos apresentaram maiores valores de peso absoluto do baço ($F_{(1, 64)} = 99,41$, $p < 0,0001$), coração ($F_{(1, 64)} = 137,43$, $p < 0,0001$), fígado ($F_{(1, 64)} = 81,15$, $P < 0,0001$), gordura abdominal ($F_{(1, 64)} = 8,15$, $p < 0,0001$) e rins ($F_{(1, 134)} = 151,16$, $p < 0,0001$), e as fêmeas maiores valores para suprarrenais ($F_{(1, 134)} = 39,47$, $p < 0,0001$) (Tabela 1). Foi encontrado efeito de interação dieta e sexo ($F_{(2, 134)} = 3,52$, $p < 0,05$) para peso absoluto das suprarrenais. As fêmeas R e C apresentaram maiores valores do que os machos, e as J menores valores que as C (Tabela 1).

Os animais J e R apresentaram menores valores de peso relativo da gordura abdominal ($F_{(2, 64)} = 11,10$, $p < 0,0001$) em relação aos C (Tabela 2). Os machos demonstraram maiores valores de peso relativo do baço ($F_{(1, 64)} = 7,04$, $p < 0,05$), e as fêmeas maiores valores de peso relativo da gordura abdominal ($F_{(1, 64)} = 8,22$, $p < 0,01$) e suprarrenais ($F_{(1, 134)} = 22,93$, $p < 0,0001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Peso relativo dos órgãos e gordura abdominal dos animais pós-lactação (53º dia).

Órgãos/Gordura (%)	C		J		R	
	M	F	M	F	M	F
Baço	3,39 ± 0,13	3,00 ± 0,06	3,39 ± 0,11	3,28 ± 0,11	3,40 ± 0,12	3,16 ± 0,14
Coração	3,55 ± 0,08	3,54 ± 0,06	3,42 ± 0,07	3,51 ± 0,05	3,51 ± 0,04	3,53 ± 0,08
Fígado	41,39 ± 0,57	42,62±1,13	43,03±0,92	44,34±0,73	44,05±0,88	42,97±0,92
Suprarrenais	5,43 ± 0,20	6,01 ± 0,23	5,30 ± 0,23	5,49 ± 0,15	4,81 ± 0,13	6,20 ± 0,15
Rins	4,31 ± 0,06	4,49 ± 0,08	4,37 ± 0,08	4,51 ± 0,06	4,42 ± 0,04	4,39 ± 0,06
Testículos	5,90 ± 0,11	-	5,69 ± 0,09	-	5,82 ± 0,09	-
Gordura	33,24 ± 1,50	36,89±1,59	28,69±1,47	31,80±1,57	28,20 ± 0,81	30,64±0,60

Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); M – filhotes machos; F – filhotes fêmeas.

Foi obtido também efeito de interação dieta e sexo (Tabela 2; $F_{(2, 134)} = 5,45$, $p < 0,01$) para peso relativo das suprarrenais. As fêmeas R apresentaram maiores valores que os machos; os machos R menores valores do que os C; as fêmeas J menores valores que as R e C. Não houve diferença estatística para o peso relativo do coração, fígado, rins e testículos (Tabela 2).

3.2.3 Análises bioquímicas

Nas análises bioquímicas, os animais J apresentaram menores níveis séricos de glicose (Fig. 4A; $F_{(2, 64)} = 23,41$, $p < 0,0001$) e maiores de triacilglicerol (Fig. 4C; $F_{(2, 64)} = 6,99$, $p < 0,005$), comparado aos R e C.

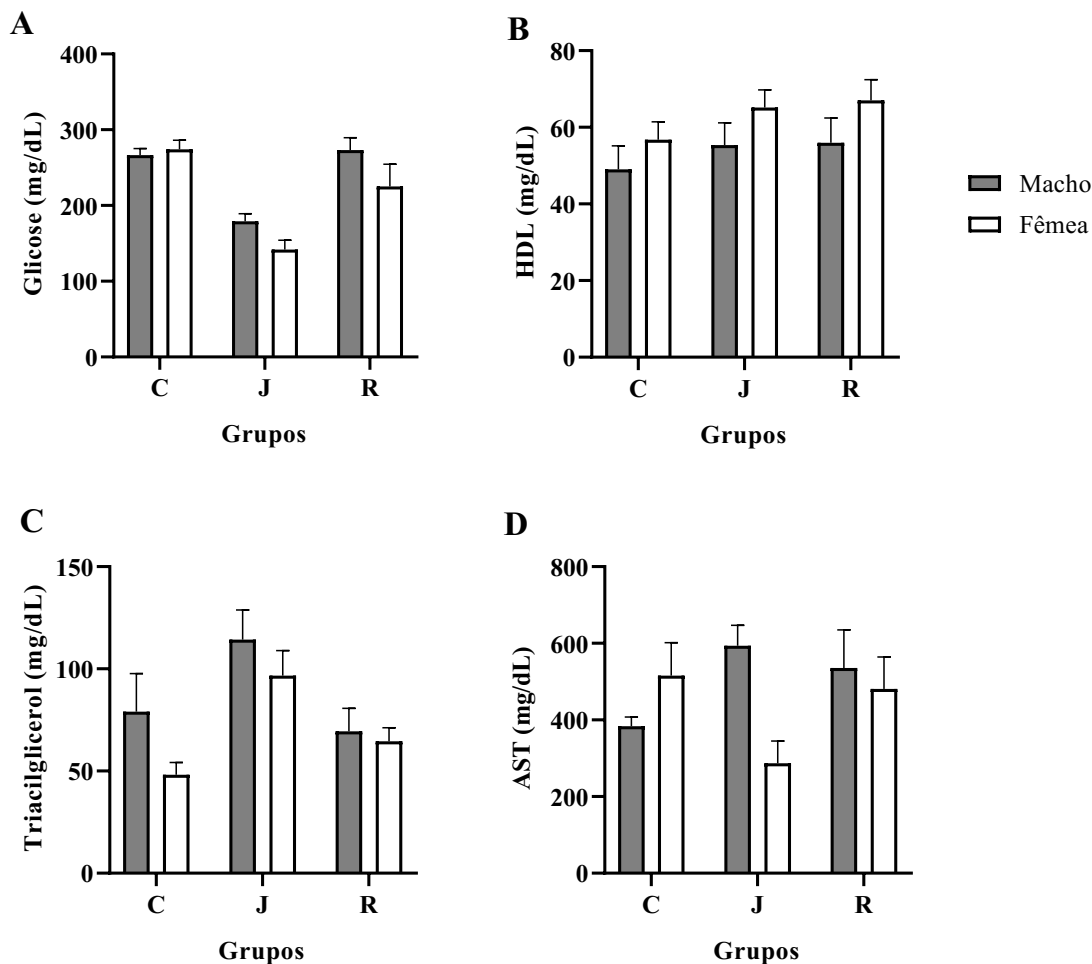


Fig. 4. Glicose (A), HDL (B), Triacilglicerol (C) e AST (D) dos animais pós-lactação (53º dia). Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

Os níveis séricos de HDL das fêmeas foram maiores comparados aos machos (Fig. 4B; $F_{(1, 64)} = 4,39$, $p < 0,05$) e foi encontrado efeito de interação dieta e sexo para AST (Fig. 4D; $F_{(2, 42)} = 4,79$, $p < 0,05$), os machos do grupo J apresentaram maiores valores que as fêmeas. Não foram encontradas diferenças estatísticas para colesterol total, bilirrubina, creatinina e ALT (Tabela 3).

Tabela 3. Colesterol, creatinina, bilirrubina e ALT dos animais pós-lactação (53º dia).

Análises (mg/dL)	C		J		R	
	M	F	M	F	M	F
Colesterol	209,37±48,71	218,39 ±15,06	203,56± 11,21	183,87±19,22	207,83±6,28	214,35±13,48
Creatinina	0,70 ± 0,06	0,45±0,07	0,74 ± 0,04	0,54 ± 0,08	0,41±0,07	0,60 ± 0,13
Bilirrubina	2,87± 1,35	2,31±0,36	3,21± 0,58	5,63± 1,66	3,63±0,96	3,08 ± 1,05
ALT	398,44±55,95	406,25±90,15	383,93±22,65	421,88±37,35	339,29± 27,64	361,11 ±80,20

Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); M – filhotes machos; F – filhotes fêmeas; ALT – alanina aminotransferase.

3.3 Avaliação Comportamental

3.3.1 Campo aberto (CA)

No campo aberto os machos saíram do centro mais rápido (Fig. 5A; $F_{(1, 81)} = 7,76$, $p < 0,01$) do que as fêmeas. Também foi observado efeito de interação dieta e sexo ($F_{(2, 81)} = 3,77$, $p < 0,05$), no grupo C os machos apresentaram maior latência de saída do centro em relação as fêmeas, e os machos J menor latência comparado aos C (Fig. 5A).

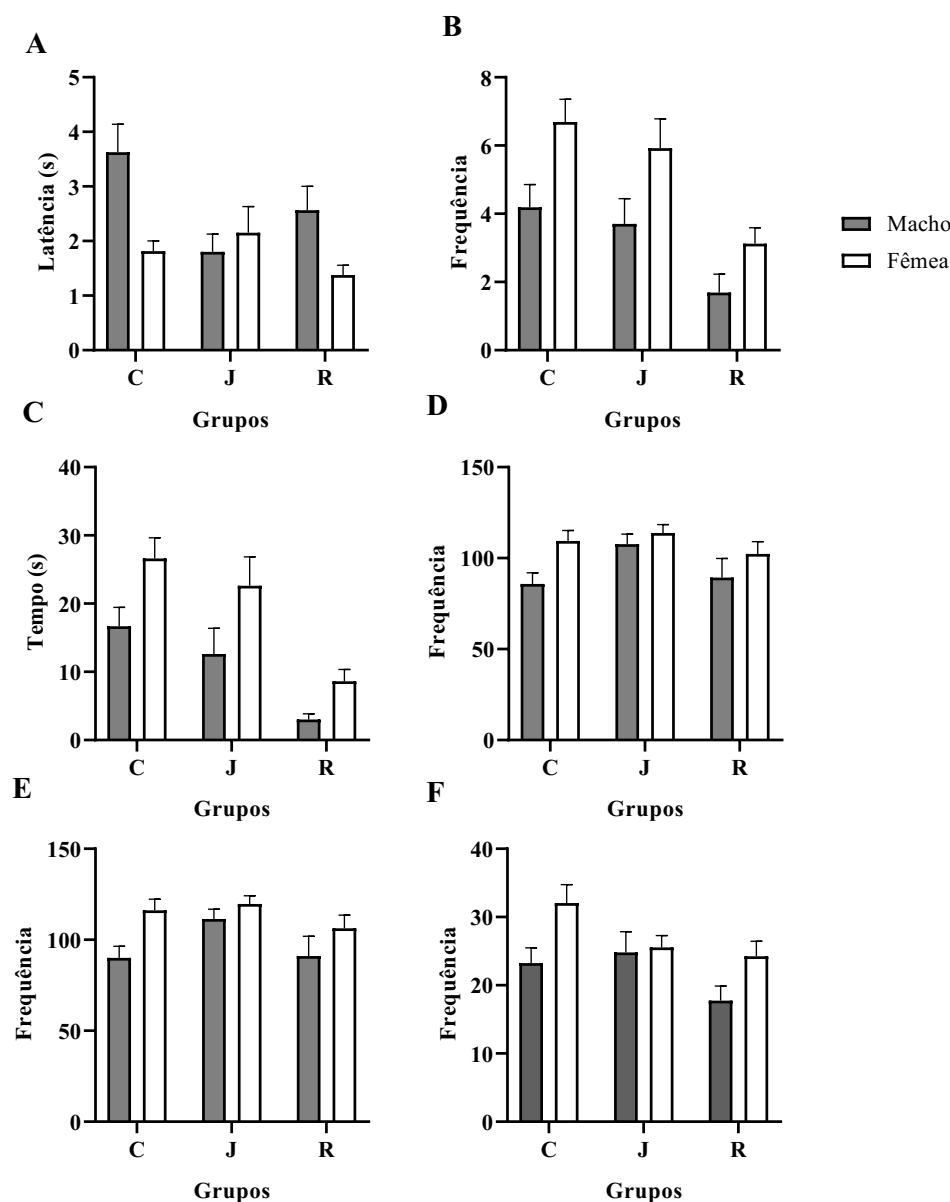


Fig. 5. Latência de saída (A), frequência (B) e tempo (C) no centro, frequência, quadrantes periféricos atravessados (D), total (E) e ficar de pé (F) no teste de Campo Aberto dos animais pós-lactação. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

Os animais R entraram (Fig. 5B; $F_{(2, 81)} = 12,93$, $p < 0,001$) e permaneceram menos tempo (Fig. 5C; $F_{(2, 81)} = 19,18$, $p < 0,0001$) no centro do que os J e C; e exploraram verticalmente (Fig. 5F; $F_{(2, 81)} = 4,51$, $p < 0,05$) com menor frequência que os C.

As fêmeas entraram (Fig. 5B; $F_{(1, 81)} = 14,34$, $p < 0,0005$) e permaneceram mais tempo (Fig. 5C; $F_{(1, 81)} = 13,78$, $p < 0,0005$) no centro. Além disso, ficaram de pé (Fig. 5F; $F = 7,54$, p

< 0,01), e atravessaram mais quadrados periféricos (Fig. 5D; $F_{(1, 81)} = 5,71$, $p < 0,05$) e totais (Fig. 5E; $F_{(1, 81)} = 7,05$, $p < 0,05$) em relação aos machos.

3.3.2 Teste de transição Claro – Escuro (TCE)

Não foram encontradas diferenças estatísticas nas variáveis analisadas no teste de transição claro-escuro (Tabela 4).

Tabela 4. Teste de transição claro-escuro dos animais pós-lactação.

Avaliações	C		J		R	
	M	F	M	F	M	F
Latência (s)	15,71 ± 3,71	14,57 ± 2,76	9,30 ± 2,27	10,77 ± 3,01	8,31 ± 1,96	10,47 ± 2,72
F C	6,00 ± 0,57	7,36 ± 0,48	7,00 ± 0,33	6,92 ± 0,64	5,94 ± 0,57	6,75 ± 0,63
T C (s)	87,36 ± 8,74	100,79 ± 7,49	91,20 ± 12,22	94,39 ± 9,21	71,31 ± 8,03	92,50 ± 6,93
F E	5,79 ± 0,54	7,21 ± 0,49	6,78 ± 0,40	6,46 ± 0,62	5,75 ± 0,55	6,63 ± 0,62
T E (s)	211,93 ± 8,91	198,86 ± 7,44	209,60 ± 12,45	205,46 ± 9,20	228,50 ± 8,06	207,44 ± 6,95
FFC	1,67 ± 0,37	1,67 ± 0,33	1,88 ± 0,30	2,00 ± 0,42	2,60 ± 0,43	1,33 ± 0,21
HP	3,00 ± 0,41	1,40 ± 0,16	2,71 ± 0,42	3,09 ± 0,68	2,67 ± 0,35	2,36 ± 0,39

Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos); R (Restrição Proteico-Calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); M – filhotes machos; F – filhotes fêmeas; FC – frequência no lado claro; TC – tempo no lado claro; FE - frequência no lado escuro; TE – tempo no lado escuro; FFC – frequência de falsas entradas no lado claro; HP – *head poke*.

4 DISCUSSÃO

O jejum intermitente e a restrição proteico-calórica durante a lactação acarretaram em desnutrição no desmame e prejuízos no desenvolvimento e crescimento corporal na adolescência. Estudos relatam que dietas restritivas aplicadas nos estágios iniciais da vida, como a lactação, são modelos eficientes para causar desnutrição em roedores ao desmame [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26].

Nessa perspectiva, corroborando com o menor peso corporal, CNA e IMC dos animais J e R encontrados no 21º dia de vida, estudos demonstraram que a restrição proteica e proteico-calórica à 50% durante a lactação, promoveram peso [21, 26, 27] e crescimento corporal reduzido na prole ao desmame [26].

Neste estudo, após o desmame e com a introdução da ração *ad libitum* foi evidenciado aumento progressivo do peso corporal ao longo do tempo, entretanto, os animais J e R

permaneceram com menor peso indicando que estava adequado ao menor tamanho corporal comprovado pelo IMC que não apresentou diferença entre os grupos desta forma, revertendo o estado nutricional encontrado no desmame.

Os impactos no peso e principalmente para o tamanho corporal provocados pelo jejum intermitente e restrição proteico-calórica materna durante a lactação, persistiram até a adolescência, no qual as fêmeas foram menores e mais leves que os machos, mesmo após o período de reabilitação nutricional. Tais resultados demonstram que os efeitos da desnutrição precoce foram duradouros e concordam com outros estudos que realizaram a reabilitação nutricional abrangendo a fase adulta [26, 28,29,30].

É reportado na literatura que o peso e tamanho corporal são determinados no período perinatal (gestação e/ou lactação), dependendo das condições nutricionais maternas [26,30, 31]. Por se tratar de um período de intenso ganho de massa corporal para a prole, a mãe necessita de suprimentos adequados durante a lactação para assegurar o crescimento somático [32]. Desta forma, as restrições alimentares podem comprometer a proliferação e diferenciação celular nas fases iniciais da vida, e afetar permanentemente a quantidade de células nos tecidos [28,33, 34].

Acredita-se que a desnutrição durante as fases de intenso desenvolvimento pode retardar o crescimento somático, além de causar alterações físicas e fisiológicas, com consequências permanentes e/ou tardias para a saúde [35, 36].

Os prejuízos da desnutrição precoce, conseqüentemente refletiram no peso dos órgãos. O menor peso absoluto dos órgãos para os grupos J e R e maiores para machos exceto as suprarenais, encontrados neste estudo, concordam com os dados da literatura e sugerem que os órgãos são proporcionais ao tamanho corporal [37, 38] e ao sexo [31].

Relata-se que, animais expostos no início da vida à subnutrição ou desnutrição podem ter a funcionalidade de diversos órgãos comprometida, além de alterações celulares que podem levar ao seu atrofiamento [39, 40].

Por outro lado, a ausência de efeito da dieta para o peso relativo dos órgãos, demonstra que estes foram poupados em relação a outros tecidos corporais e pode ser explicada do ponto de vista evolutivo. Para manter a sobrevivência na desnutrição precoce, ocorre uma economia de energia, preservando seletivamente alguns tecidos e órgãos em detrimento de outros, para não comprometer a função dos órgãos [41].

O jejum intermitente e a restrição proteico-calórica materna durante a lactação resultaram em menor ingestão de hídrica, alimentar, calórica, peso corporal e gordura abdominal de seus filhotes, tanto machos quanto fêmeas. Na literatura estudos utilizando a

restrição proteica [23,42,43] ou proteico-calórica [23,42] durante a lactação, encontraram resultados análogos aos do presente estudo. Entretanto, a restrição proteico-calórica a 50% durante as 2 primeiras semanas da lactação, promoveu menor peso corporal, acúmulo de gordura e hiperfagia em filhotes de ratos Wistar em idade adulta [44].

Nessa perspectiva, o maior CEE dos grupos J e R pode ser explicado devido a redução da taxa metabólica basal, que ocorre em animais tratados com dietas de restrição grave desde o início da vida [45]. Em resposta à redução da energia causada pelas dietas restritivas, para manter os processos essenciais ao organismo, os animais foram mais eficientes em transformar as calorias ingeridas, em ganho de peso. Da mesma forma, o menor acúmulo de reservas energéticas, com reduzida deposição de gordura na região abdominal, está associado ao ganho de peso reduzido.

De acordo com a literatura, ratos regulam sua ingestão alimentar de acordo com suas necessidades energéticas [46], desta forma, por serem menores e mais leves, consumiram uma menor quantidade de ração, porém suficiente para garantir seu aporte nutricional e ganho de peso.

Devido ao mecanismo de distensão da parede gástrica durante a refeição, que estimula e libera hormônios anorexígenos, dentre eles a leptina, colecistocinina e a insulina, levando a inibição da ingestão de alimentos [47], os animais não demonstraram aumento na ingestão alimentar, sugerindo não haver aumento compensatório no consumo alimentar após o período de desnutrição [23].

As dietas utilizadas não impactaram sobre os níveis séricos de colesterol total, bilirrubina, creatinina e alanina aminotransferase. Entretanto, as fêmeas tiveram aumentos nos níveis de HDL e o marcador plasmático de função hepática aspartato aminotransferase, estava aumentado nos machos do grupo J. Dados semelhantes foram encontrados em filhotes machos e fêmeas, que receberam restrição proteico-calórica a 50% durante a lactação e reabilitação nutricional até o 160º dia de vida pós-natal [31], indicando disfunção hepática.

Neste estudo, o grupo J reduziu os níveis séricos de glicose e promoveu aumento dos triglicerídeos. Em um estudo, foi demonstrado que a restrição alimentar materna de 50% durante o período de lactação, embora provoque um fenótipo magro na prole de roedores adulta, levou ao comportamento hiperfágico, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia sem alterações na glicemia. Os autores discutem que, os triglicerídeos plasmáticos elevados são as principais características iniciais de condições associadas a uma desregulação no metabolismo da glicose e podem prever o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) ao longo do tempo [48].

O grupo R e os machos, demonstraram comportamento semelhante a ansiedade no teste do campo aberto, visto que entraram e permaneceram menos tempo no centro, além de explorarem menos verticalmente, sem alterações na locomoção. Na literatura, camundongos C57BL/6J machos tratados durante a lactação com dieta de restrição proteico calórica 70% materna, não evidenciaram comportamento ansioso no campo aberto, mas reduziram sua locomoção e exploração vertical na adolescência e vida adulta [49].

Por outro lado, a restrição proteico-calórica materna, durante a lactação foi reportada anteriormente por ocasionar aumento da atividade exploratória na prole adolescente de camundongos [42]. Em geral, roedores resistem entrar e permanecer na área central do teste de campo aberto, o que pode ser classificado como uma medida da ansiedade.

Os resultados sugerem que a desnutrição materna durante a lactação pode causar menor atividade exploratória e aumento do comportamento de ansiedade nos filhotes. Entretanto, era esperado que o grupo J também evidenciasse aumento da ansiedade no campo aberto, por se tratar de uma dieta restritiva. Da mesma forma, não foram observadas alterações no teste de transição claro-escuro. Devido as condições experimentais, como iluminação, serem diferentes em cada teste comportamental, as alterações no comportamento não foram evidenciadas em ambos os testes comportamentais analisados. Estudos ainda reportam que, as alterações comportamentais podem diferir dependendo do grau de restrição, do período que restrição abrange ou da espécie estudada [49, 50].

No presente estudo, mostramos que as restrições alimentares maternas durante a lactação influenciaram o estado nutricional pós-desmame, crescimento, atividade exploratória e o comportamento de ansiedade da prole na adolescência, sugerindo a importância da nutrição materna nesse período. Além disso, a manutenção de um estado nutricional materno adequado durante as fases iniciais da vida são essenciais para o desenvolvimento da prole e pode ajudar a promover um estilo de vida saudável na vida adulta.

5 CONCLUSÕES

O jejum intermitente e a restrição proteico-calórica materna durante a lactação desnutriram a prole ao desmame e impactaram na redução da gordura abdominal, peso, ganho de peso e tamanho corporal de machos e fêmeas na adolescência, após a reabilitação nutricional durante 32 dias. A restrição proteico-calórica materna durante a lactação induziu ansiedade na prole.

6 REFERÊNCIAS

- [1] A. Amaro, F.I. Baptista, P. Matafome, Programming of future generations during breastfeeding: The intricate relation between metabolic and neurodevelopment disorders, *Life Sciences* 298 (2022) 120526. < <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120526>>.
- [2] L. Ellsworth, E. Harman, V. Padmanabhan, B. Gregg, Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity, *Reproduction* 156 (2) (2018) 23–42.< <https://doi.org/10.1530/rep-17-0780>>.
- [3] N.G. Morais, T.B. Costa, A.L.F. Pedrosa, M.C.A.B. Castro, S.C.G. Albuquerque, V.R.A. Pereira, V.R.A. Pereira, M.P. Cavalcanti, C.M.M.B. Castro, Effect of neonatal malnutrition on expression of nitric oxide synthase enzyme, production of free radicals and in vitro viability of alveolar macrophages infected with methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *European Journal of Nutrition* 55 (1) (2015) 403–411. <<https://doi.org/10.1007/s00394-015-0861-x>>.
- [4] C. Peila, D. Gazzolo, E. Bertino, F. Cresi, A. Coscia, Influence of Diabetes during Pregnancy on Human Milk Composition. *Nutrients*, 12 (1) (2020) 185. < <https://doi.org/10.3390/nu12010185>>.
- [5] N.J. Andreas, B. Kampmann, K.M. Le-Doare, Human breast milk: a review on its composition and bioactivity, *Early Hum Dev.* 91 (11) (2015) 629 – 635. <<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>>.
- [6] G.L. Rodríguez-González, C.J. Bautista, K.I. Rojas-Torres, P.W. Nathanielsz, E. Zambrano, Importance of the lactation period in developmental programming in rodents, *Nutrition Reviews* 78 (S2) (2020) 32-47. <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa041>>.
- [7] D.L. Almeida, F.S. Simões, L.P.J. Saavedra, A.M.P. Moraes, C.C.I. Matusso, A. Malta, K. Palma-Rigo, P.C.F. Mathias, Maternal low-protein diet during lactation combined with early overfeeding impair male offspring's long-term glucose homeostasis, *Endocrine* 63 (2018) 62–69. <<https://doi.org/10.1007/s12020-018-1719-9>>.
- [8] L.A. Pires, A.F. Junior, C.A. Chagas, J.H. Manaia, V.S. Gameiro, M.A. Babinski, Maternal undernutrition during lactation leads to reduction in skull size and thickness of adult-aged Wistar rats. *Archives of Medical Science* 17 (4) (2021) 1093-1099.< <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.92433>>.

- [9] M. Alamy, W.A. Bengelloun, Malnutrition and brain development: An analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36 (2012) 1463-1480. <<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.03.009>>.
- [10] R.F. Rodgers, J.L. O'Flynn, A. Bourdeau, E. Zimmerman, A biopsychosocial model of body image, disordered eating, and breastfeeding among postpartum women. *Appetite*, 126 (2018) 163-168. <<https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.04.007>>.
- [11] M.E. Lovering, R.F. Rodgers, J.E. George, D.L. Franko, Exploring the Tripartite Influence Model of body dissatisfaction in postpartum women, *Body Image*. 24 (2018) 44-54. <<https://doi.org/10.1016/j.bodyim.2017.12.001>>.
- [12] M.F. Lee, S.L. Williams, K.J. Burke, Striving for the thin ideal post-pregnancy: a cross-sectional study of intuitive eating in postpartum women, *Journal of Reproductive and Infant Psychology* 38 (2) (2020) 127-138. <<https://doi.org/10.1080/02646838.2019.1607968>>.
- [13] K. Rounsefell, S. Gibson, S. McLean, M. Blair, A. Molenaar, L. Brennan, H. Truby, T.A. McCaffrey, Social media, body image and food choices in healthy young adults: A mixed methods systematic review, *Nutrition & Dietetics* (2019). <<https://doi.org/10.1111/1747-0080.12581>>.
- [14] T.B.D. Costa, N.G.D. Morais, A.L.F. Pedrosa, S.D.C.G. Albuquerque, M.C.A.B. Castro, V.R.A. Pereira, M. P. Cavalcanti, C.M.M.B. Castro, Neonatal malnutrition programs the oxidant function of macrophages in response to *Candida albicans*, *Microbial Pathogenesis* 95 (2016) 68–76. <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.012>>.
- [15] M. Kumon, K. Yamamoto, A. Takahashi, K. Wada, E. Wada, Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice. *Neurochemistry International* 57(1) (2010). 43–50. <<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.04.009>>.
- [16] K.C. Montgomery, The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior, *J Comp Physiol Psychol* 48 (4) (1955) 254-260. <<https://doi.org/10.1037/h0043788>>.
- [17] J. Crawley, F.K. Goodwin, Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 13 (2) (1980) 167–170. <[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)>.

- [18] A. Rojas, T. Ganesh, Z. Manji, T. O'Neill, R. Dingleline, Inhibition of the prostaglandin E2 receptor EP2 prevents status epilepticus-induced deficits in the novel object recognition task in rats, *Neuropharmacology* 110 (2016) 419–430. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.028>>.
- [19] Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Methods of Analysis, 17th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington (2002).
- [20] C.J. Dorantes-Barrios, E. Domínguez-Salazar, O. Gonzalez-Flores, E.C.es-Barberena, G.Hurtado-Alvarado, *Physiology & Behavior* 241 113566 (2021). <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113566>>.
- [21] A. Rocha-Gomes, A.E. Teixeiraa, D.S.S. Lima, L.S. Rocha, A.A. Silvae, M. R. Lessa, N.AV.D. Pinto, S.R. Stuckert-Seixas, T.R. Riul, Caloric restriction or cafeteria diet from birth to adulthood increases the sensitivity to ephedrine in anxiety and locomotion in Wistar rats, *Physiology & Behavior* 236 (2021) 113430. <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113430>>.
- [22] T.R. Riul, S.S. Almeida, Feed restriction since lactation has reduced anxiety in adult Wistar rats, *Rev Nutr.* 33 (2020) 13. <<https://doi.org/10.1590/1678-9865202033e190143>>.
- [23] A.C. Dutra-Tavares, J.O. Silva, A.L. Nunes-Freitas, V.M.S. Guimarães, U.C. Araújo, E.P.S. Conceição, E.G. Moura, P.C. Lisboa, C.C. Filgueiras, A.C. Manhães, Y. Abreu-Villaça, A.Ribeiro-Carvalho, Maternal undernutrition during lactation alters nicotine reward and DOPAC/dopamine ratio in cerebral cortex in adolescent mice, but does not affect nicotine-induced nAChRs upregulation, *International Journal of Developmental Neuroscience* 65 (2018) 45–53. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.007>>.
- [24] I.P. Martins, J.C. Oliveira, A. Pavanello, C. C. I. Matusso, C. Previante, L.P. Tófolo, T.A. Ribeiro, C.C.S. Franco, R.A. Miranda, K.V.Prates, V.S.Alves, F.A. Francisco, A.M.P. Moraes, P.C.F. Mathias, A. Malta, Protein-restriction diet during the suckling phase programs rat metabolism against obesity and insulin resistance exacerbation induced by a high-fat diet in adulthood, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 57 (2018) 153–161. <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.017>>.
- [25] D.S.C. Lima, E.S. Francisco, C.B. Lima, R.C.A. Guedes, Neonatal L-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression, and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size- and large size litters, *Amino Acids*, 49 (2) (2016). <<https://doi.org/10.1007/s00726-016-2365-2>>.

- [26] R.O. Soares, E. Horiquni-Barbosa, S.S. Almeida, J.J. Lachat, Environmental enrichment protects spatial learning and hippocampal neurons from the long-lasting effects of protein malnutrition early in life, *Behavioural Brain Research* 335 (2017) 55–62. <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.012>>.
- [27] G.D.S. Miranda, T.A.L. Lima, H.O. Costermani, C.L.R.S. Ricken, J.P.S.S. Parrela, B.L.A. Membrive, R.E. Almeida, J.C. Facchi, L.R. Oliveira, R.A. Miranda, E.G. Moura, P.C. Lisboa, J.C. Oliveira, Breastfeeding undernutrition changes iBAT-involved thermogenesis protein expression and leads to a lean phenotype in adult rat offspring, *The Journal of Nutritional Biochemistry* (2022) 108857. <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108857>>.
- [28] N.G. Morais, T.B. Costa, L.F.F. Lima, D.S. Basílio, N.N.G. Morais, M.P. Cavalcanti, C.M.M. B. Castro, Impact of neonatal malnutrition on expression TLR-9, NF-kB and cytokines of macrophages infected in vitro with methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Microbial Pathogenesis*, 132 (2019) 254–260. <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.009>>.
- [29] I.M. Bertasso, E.G. Moura, C.B. Pietrobon, S.S. Cabral, G.E.G. Kluck, G.C. Atella, A.C. Manhães, P.C. Lisboa, Low protein diet during lactation programs hepatic metabolism in adult male and female rats, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 108 (2022). <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109096>>.
- [30] R. Guzman, J. Medina, A.I. Saulsbery, J.L. Workman, Rotated nursing environment with underfeeding: A form of early-life adversity with sex- and age-dependent effects on coping behavior and hippocampal neurogenesis, *Physiology & Behavior* 225 (113106) (2020). <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113106>>.
- [31] G.J. Howie, D.M. Sloboda, M.H. Vickers, A desnutrição materna durante janelas críticas de desenvolvimento resulta em efeitos diferenciais e específicos do sexo na adiposidade pós-natal e perfis metabólicos relacionados na prole de ratos adultos. *British Journal of Nutrition*, 108 (02) (2011) 298–307. <<https://doi.org/10.1017/s000711451100554x>>.
- [32] B.M. Lotufo, F. Tenório, P.C. Barradas, P.L. Guedes, S.S. Lima, M.L. Rocha, V.H.D. Pinheiro, V.S.T. Rodrigues, P.C. Lisboa, C.C. Filgueiras, Y.A. Villaça, A.C. Manhães. Maternal protein-free diet during lactation programs male Wistar rat offspring for increased novelty-seeking, locomotor activity, and visuospatial performance, *Behavioral Neuroscience* 132 (2) (2018) 114-127. <<http://dx.doi.org/10.1037/bne0000234>>.

- [33] T.B.D. Costa, N.G.D. Morais, A.L.F. Pedrosa, S.D.C.G. Albuquerque, M.C.A.B. Castro, V.R.A. Pereira, M.P. Cavalcanti, C.M.M.B. Castro, Neonatal malnutrition programs the oxidant function of macrophages in response to *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*, 95, (2016) 68–76. <<https://doi:10.1016/j.micpath.2016.02.012>>.
- [34] N.G. Morais, T. B. Costa, J. M.B. Lira, S.C.G. Albuquerque, V.R.A. Pereira, M.P. Cavalcanti, C.M.M.B. Castro, TLR and NLRP3 inflammasome expression deregulation in macrophages of adult rats subjected to neonatal malnutrition and infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nutrition* 33, (2017) 174–180. <<https://doi:10.1016/j.nut.2016.06.005>>.
- [35] M.L.M. Rocha, P.P. Fernandes, F. Tenório, A.C. Manhães, P.C. Barradas, Malnourishment during early lactation disrupts the ontogenetic distribution of the CART and α -MSH anorexigenic molecules in the arcuate/paraventricular pathway and lateral hypothalamus in male rats, *Brain Research* (2020) 146906. <<https://doi:10.1016/j.brainres.2020.146906>>.
- [36] B. Beauchamp, A. Thrush, J. Quizi, G. Antoun, N. McIntosh, O.Y. Al-dirbashi, M.E. Patti, M.E. Harper, Undernutrition during pregnancy in mice leads to dysfunctional cardiac muscle respiration in adult offspring, *Bioscience Reports* (2015). <<https://doi:10.1042/bsr20150007>>.
- [37] D.S. Melo, T.R. Riul, E.A. Esteves, P.L. Moraes, F.O. Ferreira, M. Gavioli, M.N.M. Alves, P.W.M. Almeida, S. Guatimosim, A. J. Ferreira M.F.D. Peixoto, Effects of severe caloric restriction from birth on the hearts of adult rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 38(8) (2013) 879–885. <<https://doi:10.1139/apnm-2012-0387>>.
- [38] L.S. Côrtes, H.S. Silveira, L.A. Lupi, T.M. Santos, M.M. Cavariani, R.F. Domeniconi, L.B. Gaiotte, D.A.M. Oliveira, L.A. Justulin, L.G.A. Chuffa, Maternal protein restriction impairs nutrition and ovarian histomorphometry without changing p38MAPK and PI3K-AKT-mTOR signaling in adult rat ovaries, *Life Sciences* (2020) 118693. <<https://doi:10.1016/j.lfs.2020.118693>>.
- [39] E.M. Widdowson, R.A. Mccance, A review: new thoughts on growth, *Pediatr Res* 9 (3) (1975) 154-156.
- [40] M. Winick, A. Noble, Quantitative changes in DNA, RNA, and protein during prenatal and postnatal growth in the rat, *Dev Biol* 12 (3) (1965) 451-66. <[https://doi:10.1016/0012-1606\(65\)90009-6](https://doi:10.1016/0012-1606(65)90009-6)>.

- [41] J.C. Wells, A.L. Sawaya, R. Wibaek, M. Mwangome, M.S. Poullas, C.S. Yajnik, A. Demaio, A dupla carga da desnutrição: vias etiológicas e consequências para a saúde, *The Lancet* 395 (10217) (2020) 75–88.<[https://doi:10.1016/s0140-6736\(19\)32472-9](https://doi:10.1016/s0140-6736(19)32472-9)>.
- [42] A.C. Dutra-Tavares, A.C. Manhães, J.O. Silva, A.L. Nunes-Freitas, E.P.S. Conceição, E.G. Moura, P.C. Lisboa, C.C. Filgueiras, Y. Abreu-Villac, A.R. Carvalho, Locomotor response to acute nicotine in adolescent mice is altered by maternal undernutrition during lactation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 47 (2015) 278–285. <<https://doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.10.00>>.
- [43] D.L. Almeida, F.S. Simões, L.P.J. Saavedra, A.M.P. Moraes, C.C.I. Matusso, A. Malta, K. Palma-Rigo, P.C.F. Mathias, Maternal low-protein diet during lactation combined with early overfeeding impair male offspring's long-term glucose homeostasis. *Endocrine* (2018).<<https://doi:10.1007/s12020-018-1719-9>>.
- [44] G.D.S.Miranda, T.A.L. Lima, H.O. Costermani, C.L.R.S. Ricken, J.P.S.S. Parrela, B. L. A. Membrive, R.E. Almeida, J.C. Facchi, L.R. Oliveira, R.A. Miranda, E.G. Moura, P.C. Lisboa, J.C. Oliveira, Breastfeeding undernutrition changes iBAT-involved thermogenesis protein expression and leads to a lean phenotype in adult rat offspring, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 99 (2022). <<https://doi:10.1016/j.jnutbio.2021.108857>>.
- [45] D.S. Melo, L.V. Costa-Pereira, C.S. Santos, B.F. Mendes, K.B. Costa, C.F.F. Santos, E. Rocha-Vieira, F.C. Magalhães, E.A. Esteves, A.J. Ferreira, S. Guatimosim, M.F. Dias-Peixoto, Severe Calorie Restriction Reduces Cardiometabolic Risk Factors and Protects Rat Hearts from Ischemia/Reperfusion Injury, *Front Physiol* 7 (106) (2016).< <http://doi:10.3389/fphys.2016.00106>>.
- [46] C.M. Patterson, B.E. Levin, Role of Exercise in the Central Regulation of Energy Homeostasis and in the Prevention of Obesity, *Neuroendocrinology* 87 (2) (2008) 65-70.<<https://doi:10.1159/000100982>>.
- [47] A. Iuras, Estudo de fatores centrais e periféricos relacionados ao controle da ingestão alimentar em modelos experimentais, *Ensaio e Ciência. Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* 13(1) (2009) 19-27.
- [48] G. Seghieri, L.Policardo, R. Anichini, F. Franconi, I. Campesi, S. Cherchi, G.Tonolo, The Effect of Sex and Gender on Diabetic Complications, *Curr Diabetes Rev.*13 (2) (2017)148-160.< <https://doi:10.2174/1573399812666160517115756>>.

[49] M. Kumon, K. Yamamoto, A. Takahashi, K. Wada, E. Wada, Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice. *Neurochemistry International*, 57(1) (2010) 43–50. <<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.04.009>>.

[50] E.A. Levay, A.G. Paolini, A. Govic, A. Hazi, J. Penman, S. Kent, Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behavioural Brain Research*, 191(2) (2008) 164–172. <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.021>>.

ARTIGO 2 - DIETA RESTRITIVA MATERNA CAUSA ANSIEDADE E ALTERA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NA AMIGDALA E HIPOTÁLAMO DA PROGÊNIE ADOLESCENTE DE RATAS WISTAR

Jéssica Sena Gonçalves^{ab}; Aline Cândida Ferreira^b; Ana Carla Silva Rocha^b; Clarice Ribeiro dos Santos^b; Leonara Teixeira Alves^b; Nícollas Costa Veloso^b; Raiana Lage Coimbra^b; Arthur Rocha Gomes^b; Alexandre Alves da Silva^b; Nisia Vilela Dessimoni Pinto^a, Tania Regina Riul^{ab1}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências da Nutrição- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus JK – Rodovia MGT, 367km 583, n° 5000, Alto do Jacuba – Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

^bLaboratório de Nutrição Experimental- Departamento de Nutrição - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus JK – Rodovia MGT, 367km 583, n° 5000, Alto do Jacuba – Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

¹ Autor de correspondência: Tania Regina Riul, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus JK – Rodovia MGT, 367km 583, n° 5000 – Alto do Jacuba – Diamantina, Minas Gerais, Brasil. E-mail: taniriul@yahoo.com.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivos avaliar os efeitos do jejum intermitente e restrição calórica aplicados durante a lactação na ansiedade, memória de longo prazo e estado redox na amígdala e hipotálamo da prole de ratas Wistar. A prole foi dividida em três grupos: Controle (C) – provenientes de mães alimentadas com ração *ad libitum* (n=32); Jejum Intermitente (J) – provenientes de mães alimentadas com ração *ad libitum* por 24 horas e nas próximas 24 horas ficavam sem acesso ao alimento, alternando entre oferta e restrição a cada 24 horas durante toda lactação (n=23) e Restrição Proteico-Calórica (R) – provenientes de mães que receberam 50% da ração consumida por C (n=32). Após o desmame, as proles foram alimentadas com ração *ad libitum* e a partir dos 49º dias de vida foram testadas no labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de reconhecimento de objetos (TRO) e eutanasiados para a retirada da gordura abdominal, amígdala e hipotálamo para avaliação do estado redox. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Newman-Keuls, quando apropriado ($p < 0,05$). Os animais J apresentaram maior percentual de entradas e de tempo, frequência de falsas entradas e frequência de idas a ponta dos braços abertos comparado ao C e R. O R aumentou a enzima superóxido dismutase na amígdala e hipotálamo. Não foram encontradas diferenças estatísticas no TRO. Todos os animais mantiveram a memória intacta e os J foram menos ansiosos e/ou mais impulsivos.

Palavras-chave: Jejum intermitente; restrição proteico-calórica; lactação; labirinto em cruz elevado; memória de longo prazo.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of intermittent fasting and caloric restriction applied during lactation on anxiety, long-term memory and redox status in the amygdala and hypothalamus of offspring of Wistar rats. The offspring were divided into three groups: Control (C) – from mothers fed ad libitum ration (n=32); Intermittent Fasting (J) – from mothers fed with ration ad libitum for 24 hours and in the next 24 hours they had no access to food, alternating between supply and restriction every 24 hours throughout lactation (n=23) and Protein-Caloric Restriction (R) – from mothers who received 50% of the ration consumed by C (n=32). After weaning, the offspring were fed with ration ad libitum and from the 49th day of life onwards they were tested in the elevated plus maze (LCE) and object recognition test (ORT) and euthanized for the removal of abdominal fat, tonsil and hypothalamus for evaluation of the redox state. Data were submitted to ANOVA and Newman-Keuls test, when appropriate ($p < 0.05$). The J animals had a higher percentage of entries and time, frequency of false entries and frequency of trips to the end of the open arms compared to C and R. The R increased the enzyme superoxide dismutase in the amygdala and hypothalamus. No statistical differences were found in the TRO. All animals kept their memory intact and the J were less anxious and/or more impulsive.

Keywords: Intermittent fasting; protein-caloric restriction; lactation; elevated plus maze; long-term memory.

1 INTRODUÇÃO

Durante a gestação mudanças na forma e peso corporal materno ocorrem devido ao crescimento e desenvolvimento fetal, bem como das alterações hormonais que preparam o organismo da mulher para o parto e amamentação [1]. Entretanto após o parto, tais mudanças podem influenciar a auto-imagem corporal de puérperas [2, 3] uma vez que o corpo da mulher se afasta do padrão de beleza imposto pela sociedade ocidental atual e reafirmado pela mídia, que supervaloriza o corpo magro [4].

Preocupadas com a aparência e buscando atingir o padrão corporal idealizado, após o parto, algumas mulheres recorrem a métodos de emagrecimento radicais como as dietas restritivas para perder o peso retido na gestação e obter a forma física idealizada [2,3,5]. Entretanto, o período pós-parto compreende a fase de lactação/amamentação, na qual o neonato depende da mãe para receber o aporte nutricional e energético adequados [6]. Desta forma, modificações no estado nutricional e metabólico materno na lactação podem ocasionar prejuízos para o desenvolvimento físico, neuronal e comportamental da prole [7].

O jejum intermitente (J) é caracterizado pela restrição na ingestão alimentar/calórica regulada pelo tempo. O indivíduo praticante desta modalidade de restrição passa um período estritamente determinado sem consumir nenhuma energia, em seguida ele tem uma janela de tempo para o livre consumo de alimentos [8]. Essa divisão de tempo pode sofrer variações e é estabelecida de diferentes maneiras. Por exemplo, o praticante pode ficar 16 horas do dia sem consumir nenhuma fonte de energia e as outras 8 horas ele pode se alimentar à vontade ou o praticante alterna 24 horas sem consumir energia com as outras 24 horas de alimentação livre [9].

A restrição proteico-calórica (R) é caracterizada pela diminuição da quantidade de alimentos ingeridos durante as 24 horas do dia. Este modelo é descrito na literatura considerando a intensidade de restrição, ou seja, é moderada quando apresenta diminuição entre 20-40% das calorias diárias e intensa quando ocorre redução de 50% ou mais dessa ingestão [10].

Em ambos os casos, não ocorre desproporcionalidade na distribuição de carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas, minerais ou fibras. Deste modo, apesar de serem ofertados nutrientes necessários para manter o metabolismo energético, a oferta não será suficiente para atender as demandas nutricionais do indivíduo [11,12].

Nas fases iniciais da vida, o uso de dietas restritivas foi descrito por ocasionar desnutrição na prole [13, 14, 15] e foi sugerido que este insulto nutricional precoce em seres

humanos são manifestados durante a infância e adolescência [16,17] e possui forte ligação com o aumento da incidência de distúrbios cognitivos e comportamentais na idade adulta [18, 19, 20].

Na literatura estudos com roedores confirmam essas alegações e reportam que restrições alimentares no período da lactação tiveram efeitos sobre o comportamento de ansiedade em animais na vida adulta [21,13] e acarretou déficits na memória [22,23].

As alterações comportamentais são indicativos de prejuízos causados após um insulto em estruturas encefálicas, como é o caso da má alimentação. Tais efeitos podem estar ligados a interferência na síntese de enzimas que atuam como antioxidantes, diminuindo sua concentração e ocasionando um estado de deficiência e conseqüentemente estresse oxidativo no cérebro [24, 25,26].

Em condições normais, há um equilíbrio entre oxidantes e os mecanismos antioxidantes, como as enzimas, que protegem o encéfalo de possíveis danos [25]. Porém o insulto nutricional promove um desequilíbrio entre a proteção e a produção de oxidantes, promovendo as alterações comportamentais [25,26].

A nutrição adequada durante a lactação/amamentação desempenha um papel fundamental na maturação e desenvolvimento encefálico [6]. Entretanto, poucos estudos salientam os efeitos das restrições alimentares maternas, especificamente do jejum intermitente, neste período para a prole. Diante disso, sabendo da importância da alimentação adequada da mãe no período de lactação, para garantir a sua saúde e o aporte nutricional para o desenvolvimento do filho, este trabalho teve por objetivos investigar o perfil comportamental de ansiedade, memória de longo prazo e a atividade antioxidante na amígdala e hipotálamo de filhotes machos e fêmeas de ratas Wistar no final da adolescência, frente aos efeitos do jejum intermitente e restrição proteico-calórica aplicados às mães durante a lactação.

2 METODOLOGIA

2.1 Princípios Éticos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental (LabNutrex), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e teve início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFVJM) parecer nº 055/2019. Os ratos foram manejados e eutanasiados de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que estão de acordo com o

National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications N°. 80-23).

Os animais foram alojados individualmente em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), acondicionadas sobre estantes ventiladas (Alesco[®]), sob condições padrões (umidade natural, temperatura de 22 ±2 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com início do claro às 6 a.m.). As caixas forradas com maravalha autoclavada foram trocadas e limpas semanalmente.

2.2 Animais e desenho experimental

Foram utilizados 87 filhotes de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) recém-desmamados (21 dias de idade) distribuídos em 3 grupos:

- **Controle (C)** – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital[®]) e água *ad libitum* durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).
- **Jejum Intermitente (J)** – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital[®]) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação e água *ad libitum* (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos).
- **Restrição proteico-calórica (R)** – filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C e água *ad libitum* durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

No período de pós-lactação todos os filhotes receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital[®]) e água *ad libitum* e foram alojados em caixas individuais durante 32 dias.

2.3 Avaliação nutricional

Os animais foram pesados individualmente a partir do desmame uma vez por semana em balança semianalítica (Bel[®]), com esses dados foi calculado o ganho de peso (peso no 53º dia – peso no 21º dia).

2.4 Avaliação comportamental

No 50º dia os animais realizaram o teste de labirinto em cruz elevado e no 51º e 52º dias o teste de reconhecimento de objetos. Todos os testes comportamentais foram realizados na sala de comportamento do LabNutrex. A sala conta com a presença de um exaustor e

lâmpada fluorescente no teto (iluminação de 130 lux). Os procedimentos descritos foram realizados pela manhã (07:00 às 12:00 p.m), em duplo cego, com a realização de filmagens por uma câmera (Sony® Handycam) acoplada ao teto da sala, para posterior análise.

2.4.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto é um aparato confeccionado em madeira com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) perpendiculares a dois braços abertos (50 x 10 cm) e uma área central (10 x 10 cm), elevados a 50cm de altura acima do piso da sala. Além disso, os braços abertos possuem em suas laterais apoios de acrílico (1 cm), para evitar quedas dos animais.

Este teste consiste em um modelo animal clássico para avaliação da ansiedade, baseado no medo característico dos roedores a espaços abertos e/ou altos. Ao serem testados, há um conflito entre a sua aversão de ambientes abertos e/ou altos e a tendência natural da espécie em explorar o ambiente novo [27].

O teste ocorreu assim como proposto em metodologias anteriores [21,28]. Cada animal foi colocado no equipamento com a cabeça voltada para os um dos braços fechados e seus movimentos foram filmados por 5 minutos. Entre cada animal, o aparato era higienizado com etanol 70%. Foram avaliados a frequência de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, fechados e de visitas ao final dos braços abertos, frequência de mergulho protegido (FMP), desprotegido (FMD) e total (FMT), falsas entradas nos braços abertos (entrada com até 3 patas) e frequência de levantar-se sob as patas traseiras (exploração vertical). Com esses dados foram calculados:

Percentual de entradas nos braços abertos (%EA) = $\frac{\text{Frequência de entradas nos braços abertos}}{(\text{frequência de entradas nos braços abertos} + \text{frequência de entradas nos braços fechados})} \times 100$.

Percentual de tempo de permanência nos braços abertos (%TA) = $\frac{\text{Tempo de permanência nos braços abertos}}{(\text{tempo de permanência nos braços abertos} + \text{tempo de permanência nos braços fechados})} \times 100$.

Tempo no centro = $300 - (\text{tempo de permanência nos braços abertos} + \text{tempo de permanência nos braços fechados})$.

2.4.2 Teste de reconhecimento de objetos (TRO)

O teste de reconhecimento de objetos foi utilizado para avaliar as alterações na memória [29]. Este foi realizado em arena quadrada de madeira (70 x 70 x 50 cm), e ocorreu em três etapas:

Habituação: os animais foram colocados individualmente no centro da arena durante 5 minutos, para familiarizar com o ambiente, para que apenas os objetos sejam a novidade.

Treino: 24h após a etapa de habituação, o animal foi recolocado no centro da arena na presença de 2 objetos idênticos (A e B, copo de vidro tipo dose) para livre exploração durante 5 minutos.

Teste de memória: após 24h da etapa de treino, o animal foi submetido a exploração na mesma arena por 5 minutos na presença do objeto familiar A e de um novo objeto (C, peça de lego verde de formato retangular), posicionado na mesma localização do objeto B na etapa de treino.

Nas etapas de treino e teste de memória, os animais foram colocados na arena de costas para os objetos e ao final de cada teste, retornaram a suas caixas no biotério e a arena e os objetos foram higienizados com etanol 70%. Posteriormente, foi observado a frequência e tempo de interação com cada objeto.

2.5 Eutanásia e coleta de amostras biológicas

Ao término dos 32 dias após o desmame os animais foram decapitados e rapidamente retirado o encéfalo (aproximadamente 1 minuto) que foi colocado em uma solução gelada (4°C) de tampão fosfato salina (*phosphate buffered saline* - PBS: NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 8,1mM; KH₂PO₄ 1,5mM). Após esse procedimento, o hipotálamo e amígdala foram dissecados, lavados em PBS, armazenados em eppendorfs, e levados imediatamente ao ultra freezer (-80°C) para posterior avaliação do estado redox.

2.5.1 Estado redox

As estruturas encefálicas foram homogenizadas em PBS gelado (50mM; pH 7,0; 4°C) e centrifugadas sob refrigeração (4°C) a 750g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para analisar a enzima antioxidante (superóxido dismutase – SOD); a capacidade antioxidante total não-enzimática (Capacidade de redução férrica do plasma - FRAP); e o índice de peroxidação lipídica (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico -TBARS). As avaliações do estado redox foram corrigidas de acordo com o total de proteína nas amostras pelo método de Bradford (1976)[30].

2.5.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD atua na linha de defesa endógena para suprimir ou prevenir modificação oxidativa não controlada de proteínas, lipídios e DNA, evitando danos celulares que podem ser irreversíveis [31]. Para a avaliação da atividade da SOD, foi adicionado na amostra uma solução contendo 50mM de fosfato de potássio monobásico e 1mM de ácido dietileno-triamino-pentacético. Em seguida, 0,2mM de pirogalol foi adicionado, sendo sua oxidação medida rapidamente em leitor de microplacas a 420nm por 250 segundos [32, 33].

2.5.1.2 Capacidade de redução férrica do plasma (FRAP)

O ensaio FRAP se baseia na capacidade antioxidante do tecido de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} na amostra [34]. Para a realização do ensaio, foi acrescentado a amostra o reagente FRAP (acetato de sódio 0,3mol/L pH 3,6; 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10mmol/L; e $FeCl_3$ 20mmol/L) e a leitura feita a 595nm em leitor de microplacas. Os resultados obtidos pelas amostras são comparados frente a uma curva padrão de $FeSO_4$, sendo reportados em nM $FeSO_4$ /mg proteína [35]. O complexo Fe^{2+} -TPTZ (ferritripidiltriázida) possui uma cor azul intensa.

2.5.1.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este índice de peroxidação lipídica tem como objetivo avaliar se existe na membrana celular do tecido a presença de algum dano causado por radicais livres, através da reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (1,1,3,3-tetraetoxipropano; MDA), resultando em uma cor rosa em condições ácidas [36]. Para a determinação de TBARS, foi adicionada na amostra uma solução contendo ácido acético (2.5M; pH 3,4), ácido tiobarbitúrico (0,8%) e doadecil sulfato de sódio (8;1%) por 90 minutos à 95°C (aquecimento em banho maria). Posteriormente, foi feita a leitura em leitor de microplacas a 532nm utilizando o MDA como padrão, sendo os resultados expressos em nmol MDA/mg proteína [33,35].

2.6 Tecido adiposo abdominal

Após a eutanásia, foi retirada a gordura abdominal (mesentérica, retroperitoneal, visceral e dos órgãos reprodutivos masculino e feminino) imersa em solução salina, seca em papel filtro e pesada em balança analítica (Shimadzu®).

2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Statistica[®], versão 10.0. Os gráficos foram elaborados com o auxílio do GraphPad Prism[®], versão 7.0. A normalidade da amostra foi avaliada pelo teste de Skewness. Os dados de avaliação nutricional, labirinto em cruz elevado e estado redox foram analisados usando a ANOVA de duas vias, com os fatores dieta (C, J e R) e sexo (machos e fêmeas). Os dados de frequência e duração de interação com os objetos foram analisados usando a ANOVA para medidas repetidas para o fator objeto (A e B na sessão de treino, A e C na sessão de memória). O teste de Newman–Keuls foi usado como teste *post hoc*, quando apropriado. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação nutricional

Os animais dos grupos J e R apresentaram menores valores no peso corporal inicial ($F_{(2, 81)} = 397,35$ $p < 0,0001$), ganho de peso ($F_{(2, 81)} = 4,15$ $p < 0,05$) e gordura abdominal ($F_{(2, 64)} = 28,19$ $p < 0,0001$) do que os C (Fig.1A, 1B e 1C, respectivamente). Em relação ao sexo, os machos apresentaram maiores valores no ganho de peso ($F_{(1, 81)} = 223,62$ $p < 0,0001$) e gordura abdominal ($F_{(1, 64)} = 8,15$ $p < 0,0001$) do que as fêmeas (Fig. 1B e 1C).

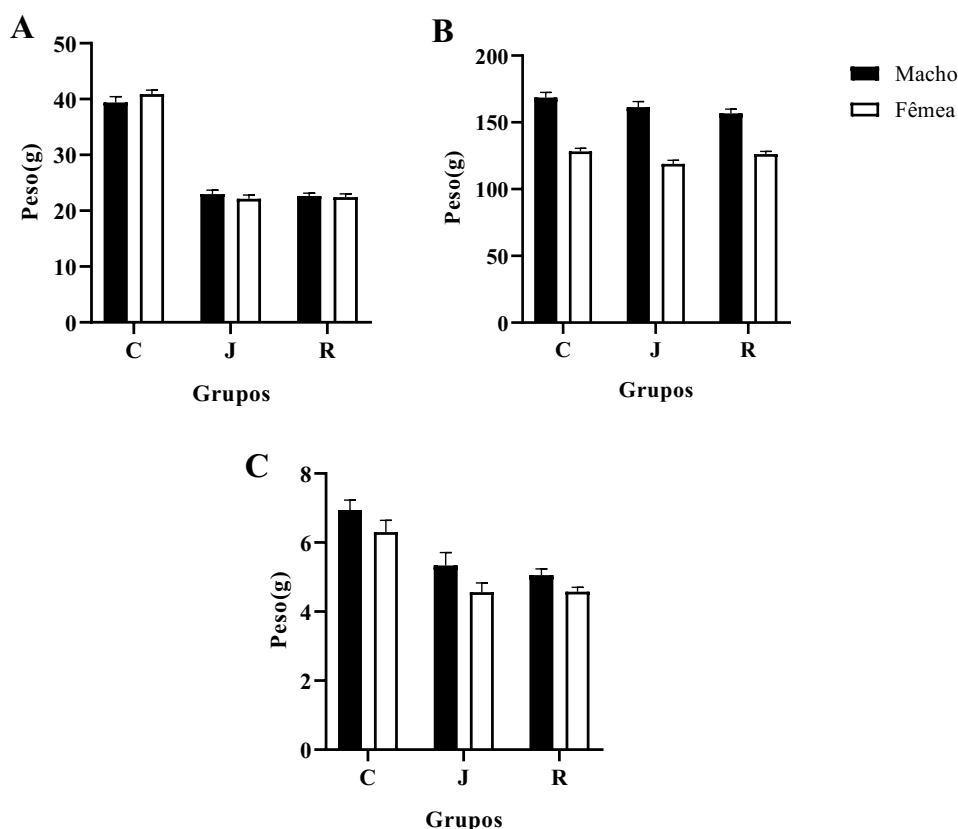


Fig. 1. Peso corporal inicial (A), ganho de peso (B) e gordura abdominal (C) de machos e fêmeas na pós-lactação. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação *ad libitum* (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C *ad libitum* durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

3.2 Avaliações comportamentais

3.2.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Os machos apresentaram maior latência de primeira entrada nos braços abertos ($F_{(1, 78)} = 4,10$, $p < 0,05$) (Fig. 2A) e menor frequência de entradas nos braços fechados ($F_{(1, 78)} = 6,30$, $p < 0,05$) (Fig. 2B) comparado as fêmeas.

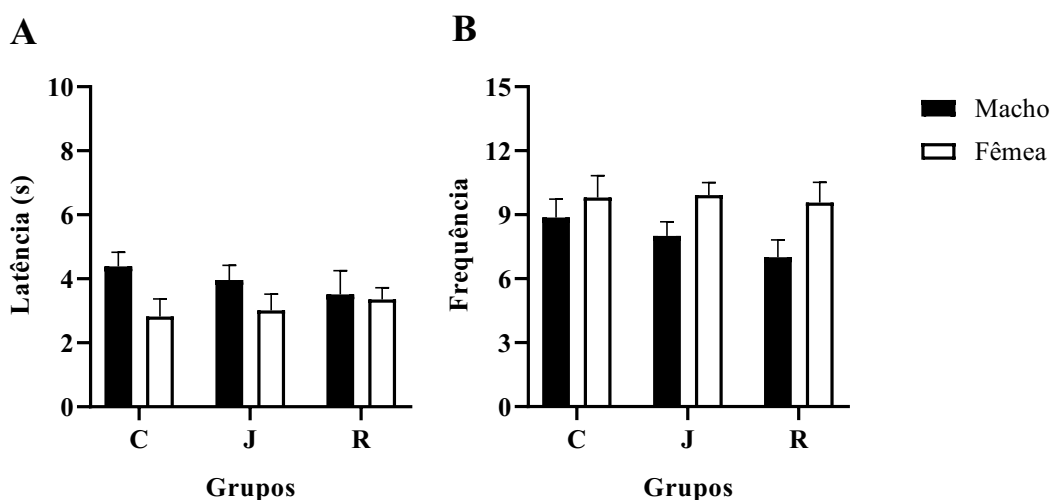


Fig. 2. Latência de primeira entrada nos braços abertos (A), frequência de entradas nos braços fechados (B) de machos e fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado no 50º dia de vida. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação *ad libitum* (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C *ad libitum* durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

Os animais do grupo J exibiram maior percentual de entradas nos braços abertos (%EA) comparado aos C ($F_{(2, 78)} = 4,10, p < 0,05$) (Fig. 3A) e maior percentual de tempo de permanência (%TA) nos braços abertos ($F_{(2, 78)} = 5,07, p < 0,01$) em relação aos demais grupos (Fig. 3B). Os machos apresentaram menores percentuais de tempo de permanência nos braços abertos ($F_{(1, 78)} = 8,29, p < 0,01$) comparado as fêmeas (Fig. 3B).

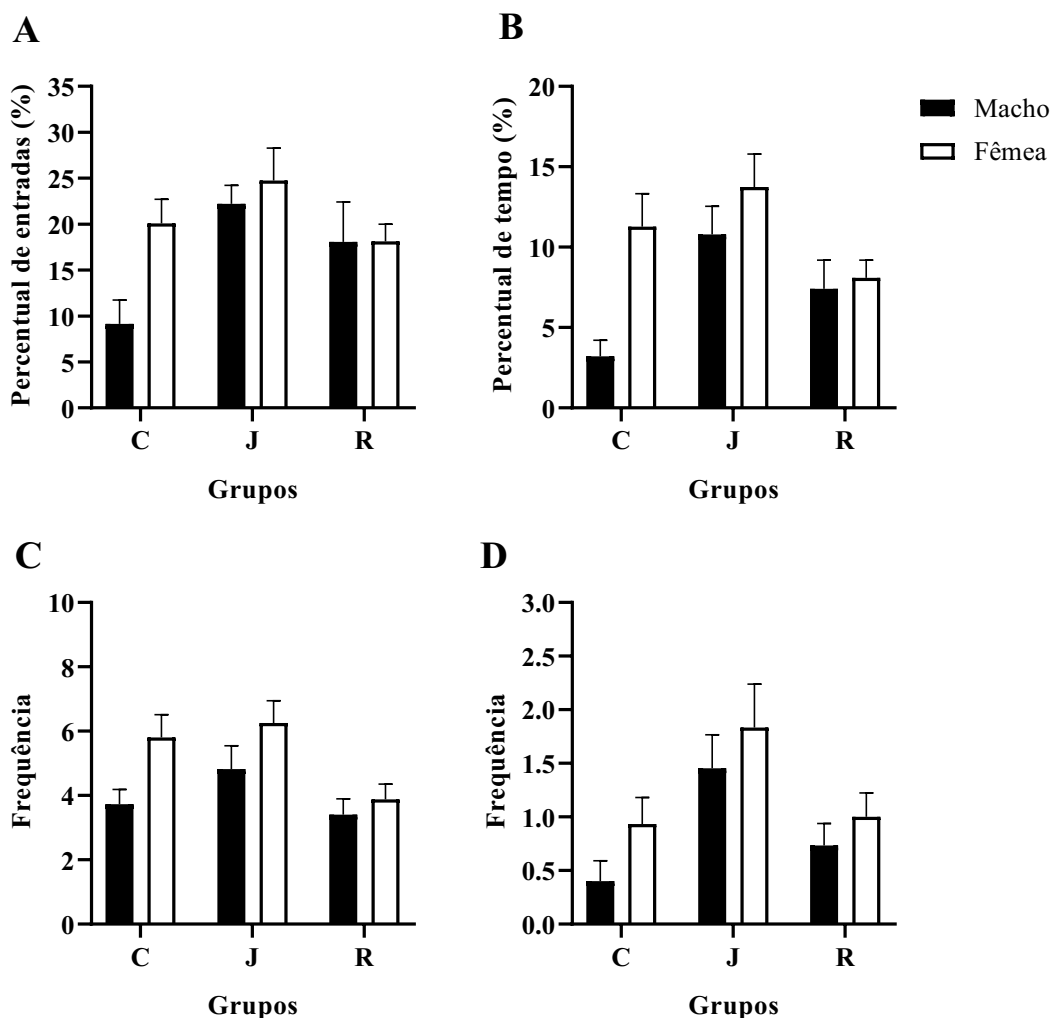


Fig. 3. Percentual de entradas (A), percentual de tempo de permanência (B), frequência de falsas entradas (C) e ida a ponta dos braços abertos (D) de machos e fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado no 50º dia de vida. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

Avaliando a frequência de falsas entradas nos braços abertos, os animais do grupo J ($F_{(2, 78)} = 5,09$ $p < 0,01$) e as fêmeas ($F_{(1, 78)} = 7,45$ $p < 0,01$) apresentaram maiores valores do que os R e os machos, respectivamente (Fig.3C). Os animais do grupo J apresentaram maior frequência de idas a ponta dos braços abertos ($F_{(2, 78)} = 7,07$ $p < 0,005$) em relação aos demais grupos (Fig.3D).

Os machos demonstraram tempo no centro ($F_{(1, 78)} = 17,45$, $p < 0,0001$) (Fig.4A) e frequência de exploração vertical ($F_{(1, 78)} = 6,05$, $p < 0,05$) (Fig.4B) menor em relação as fêmeas. Para a frequência de exploração vertical, foi obtido efeito de interação entre os fatores dieta e

sexo ($F_{(2, 78)} = 3,15, p < 0,05$), no grupo R os machos apresentaram menor frequência comparado as fêmeas (Fig. 4B).

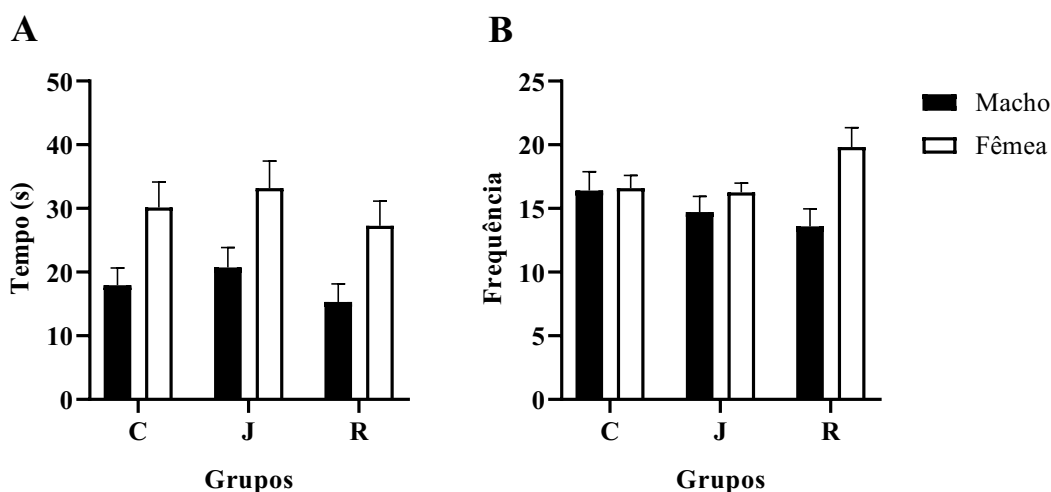


Fig. 4. Tempo no centro (A) e frequência de exploração vertical (B) de machos e fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado no 50º dia de vida. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

Os animais do grupo R apresentaram menor frequência de mergulho protegido (FMP) do que os C ($F_{(2, 78)} = 5,04 p < 0,01$) e os machos menor que as fêmeas ($F_{(1, 78)} = 6,69 p < 0,05$) (Fig. 5A).

Na frequência de mergulho desprotegido (FMD) os machos apresentaram menores valores do que as fêmeas ($F_{(1, 78)} = 8,42 p < 0,005$). Também houve efeito de interação entre dieta e sexo ($F_{(2, 78)} = 7,33 p < 0,005$), os machos R e J apresentaram maiores valores do que os machos C (Fig. 5B).

Os machos demonstraram menor frequência de mergulho total (FMT) em relação as fêmeas ($F_{(1, 78)} = 17,62 p < 0,0001$). Houve efeito de interação entre dieta e sexo ($F_{(2, 78)} = 8,88 p < 0,0005$), nos grupos C e J os machos apresentaram menor frequência comparado as fêmeas e, as fêmeas R menor frequência em relação as C e J (Fig. 5C).

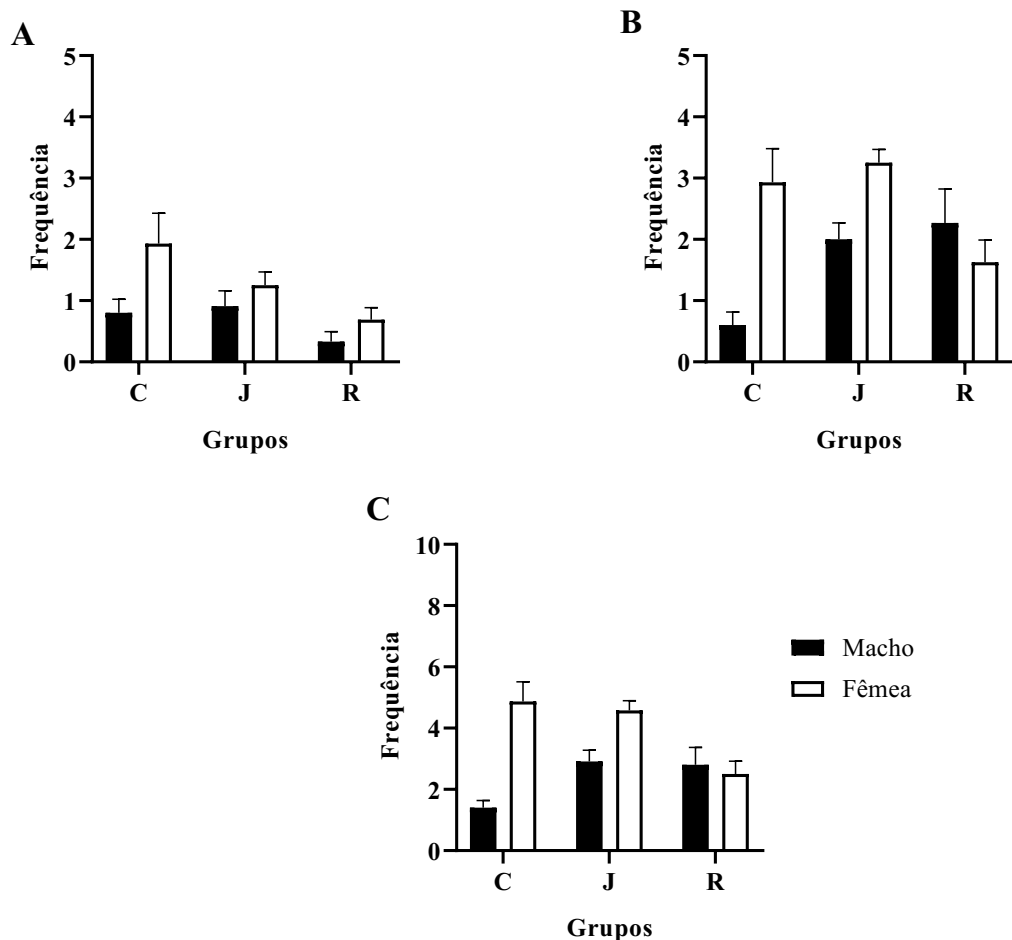


Fig. 5. Frequência de mergulho protegido (A), desprotegido (B) e total (C) de machos e fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado no 50º dia de vida. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que recebem ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

3.2.2 Teste de reconhecimento de objetos (TRO)

Na fase treino, todos os animais apresentaram maior frequência ($F_{(1, 80)} = 6,46$ $p < 0,05$) e tempo ($F_{(1, 80)} = 6,32$ $p < 0,05$) de interação com o objeto A (Fig. 6A e C) do que com o B (Fig. 6B e D). Entretanto, na fase teste de memória, todos os animais mostraram maior frequência ($F_{(1, 80)} = 177,81$ $p < 0,0001$) e tempo de interação ($F_{(1, 80)} = 252,95$ $p < 0,0001$) com o objeto C (Fig. 7B e D) do que com o A (Fig. 7A e C). Os animais do grupo J mostraram maior tempo de interação com os objetos ($F_{(2, 80)} = 3,21$ $p < 0,005$) comparado aos do R (Fig. 7 C e D).

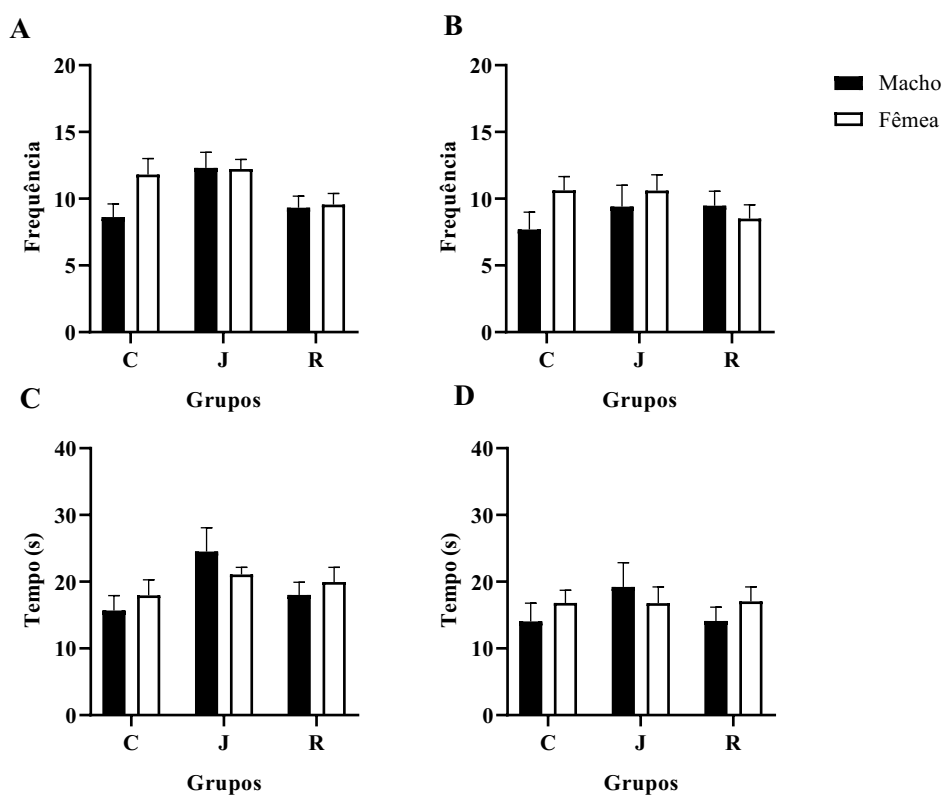


Fig. 6. Frequência e tempo de interação com os objetos A (A e C respectivamente) e B (B e D respectivamente) de machos e fêmeas na etapa de treino do teste de reconhecimento de objetos no 51º dia de vida pós-lactação. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

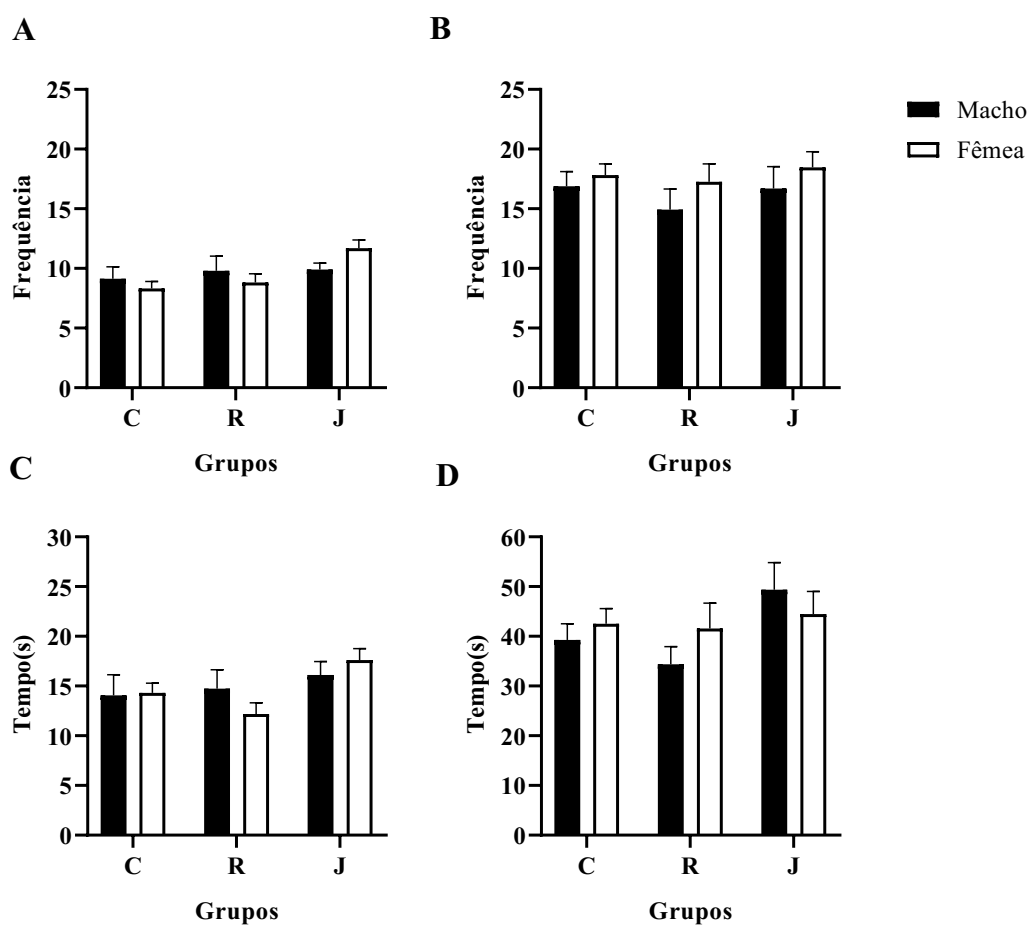


Fig. 7. Frequência e tempo de interação com os objetos A (A e C respectivamente) e C (B e D respectivamente) de machos e fêmeas na etapa de teste de memória do teste de reconhecimento de objetos no 51º dia de vida pós-lactação. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

3.3 Estado redox

Em relação a atividade de SOD, os animais R apresentaram maiores valores na amígdala ($F_{(2, 28)} = 9,09$ $p < 0,001$) e menores no hipotálamo ($F_{(2, 28)} = 5,68$ $p < 0,01$) em relação aos C e J (Fig.8A e B respectivamente) e os machos maiores valores que as fêmeas ($F_{(1, 28)} = 15,75$ $p < 0,0005$) no hipotálamo (Fig.8B). Por outro lado, como demonstrado na Tabela 1, não foram encontradas alterações nos valores de FRAP e TBARS nas duas estruturas.

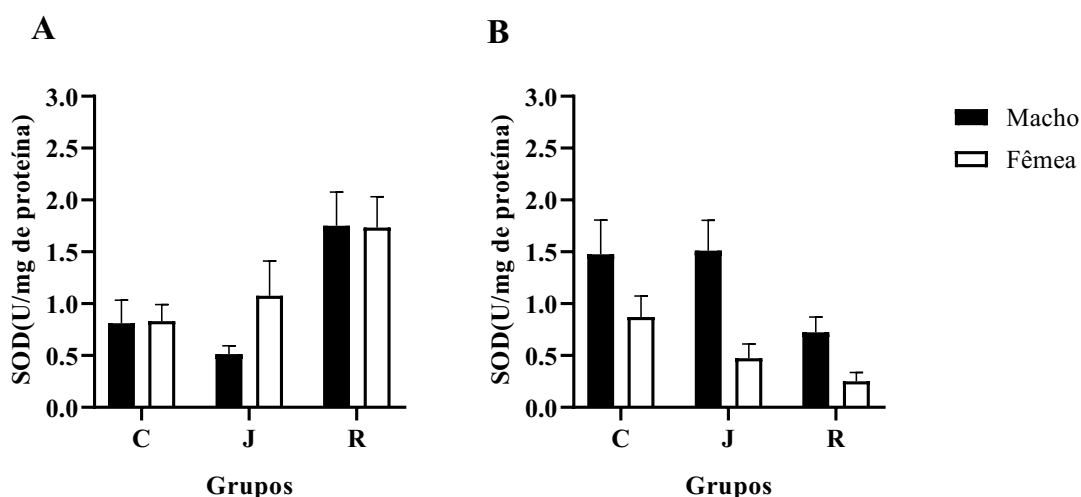


Fig. 8. Atividade da SOD na amígdala (A) e hipotálamo (B) de machos e fêmeas na pós-lactação. Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos).

Tabela 1. Capacidade antioxidante FRAP e níveis de TBARS da amígdala e hipotálamo de machos e fêmeas na pós-lactação.

Estrutura	Avaliação	C		J		R	
		M	F	M	F	M	F
Amígdala	TBARS	1,50 ± 0,09	1,59 ± 0,14	1,44 ± 0,12	1,52 ± 0,10	1,71 ± 0,11	1,52 ± 0,11
	FRAP	193,21 ± 11,97	172,07 ± 10,54	166,94 ± 14,74	169,61 ± 12,19	182,70 ± 16,18	176,16 ± 11,15
Hipotálamo	TBARS	1,00 ± 0,10	0,93 ± 0,04	1,05 ± 0,13	1,08 ± 0,01	0,90 ± 0,08	0,80 ± 0,17
	FRAP	192,74 ± 12,43	179,16 ± 3,97	170,55 ± 17,62	153,85 ± 10,41	156,51 ± 6,99	136,28 ± 33,91

Legenda: C (Controle) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); J (Jejum Intermitente) – filhotes amamentados por fêmeas que receberam ração comercial Nuvilab (Nuvital®) *ad libitum* nas primeiras 24 horas após o parto e ficaram sem acesso ao alimento pelas próximas 24 horas, alternando os períodos de oferta e restrição de dieta a cada 24 horas durante toda a lactação (n = 23, 13 fêmeas e 10 machos) e R (Restrição proteico-calórica) - filhotes amamentados por fêmeas que receberam 50% da ração consumida por C durante toda a lactação (n = 32, 16 fêmeas e 16 machos); M – filhotes machos; F – filhotes fêmeas.

4 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que o jejum intermitente na fase de lactação, ocasionou redução da ansiedade e/ou aumentou a impulsividade da prole testada na adolescência. No entanto, o mesmo não foi observado na prole submetida a restrição proteico-calórica, que, obteve aumento na atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase (SOD) na amígdala e hipotálamo.

A redução da ansiedade em animais desnutridos precocemente foi previamente descrita em modelo animal [13, 21,37, 38, 39, 40]. Neste estudo, a maior proporção de entradas, tempo de permanência e idas a ponta dos braços abertos pelos animais do grupo J indicam menor comportamento ansioso no LCE, sugerindo que o jejum intermitente materno durante a fase de lactação pode comprometer os sistemas neurais e/ou neuroquímicos que comandam a expressão comportamental dos filhotes em situações experimentais.

Os prejuízos induzidos pela desnutrição precoce no desenvolvimento e maturação das estruturas envolvidas na inibição comportamental, como a amígdala, podem resultar em menor ansiedade e/ou maior impulsividade [37]. Essa redução possui implicações importantes, uma vez que a ansiedade é uma resposta defensiva a ameaças potenciais, considerada um importante mecanismo de adaptação evolutiva, pois o estado de apreensão e vigilância pode ajudar a proteger os indivíduos de perigos [41, 42]. Desta forma, ao se exporem a ambientes abertos e altos esses animais podem ficar expostos a condições consideradas de risco [43].

Um possível mecanismo que explica a alteração na ansiedade é a desregulação de glicocorticoides e monoaminas no sistema nervoso central. Foi demonstrado anteriormente que a restrição alimentar utilizada para perda de peso, promoveu diminuição da ansiedade, e das concentrações de serotonina e dopamina [44]. Através da restrição alimentar pode ocorrer a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), considerada uma das alterações fisiopatológicas principais observada em indivíduos que sofrem transtornos de humor e ansiedade e, devido ao hipotálamo regular esse eixo, supõe-se que a desregulação da neurotransmissão de monoaminas na estrutura, promovida pela desnutrição, esteja envolvida na ansiedade [44,45].

Deve-se salientar que o sistema serotoninérgico é importante devido a regulação das respostas de ansiedade e medo na amígdala dentre outros processos fisiológicos e comportamentais [40,46]. As alterações na sinalização da serotonina podem desencadear uma série de distúrbios neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, distúrbios afetivos, ansiedade e autismo. Em particular, o estresse oxidativo tecidual está relacionado a alterações na sinalização da serotonina através da redução na produção de enzimas limitantes de velocidade, como a triptofano hidroxilase, na síntese desse neurotransmissor [47].

Na literatura, foi estabelecido uma possível relação entre a redução da ansiedade e o aumento de enzimas antioxidantes [41], entretanto a prole R que demonstrou aumento da SOD na amígdala e redução no hipotálamo, não alterou o comportamento semelhante a ansiedade, como evidenciado anteriormente [13, 48]. Estas regiões encefálicas são fundamentais na

interpretação de estímulos ansiogênicos e na regulação de comportamentos relacionados à ansiedade [42].

O aumento da capacidade antioxidante na amígdala é reportado por estar associado a prevenção de comportamentos semelhantes a ansiedade [49, 50, 51]. Essa região encefálica é determinante no processamento das ameaças ambientais, compondo um sistema hierárquico de defesa que quando estimulado produz um padrão complexo de efeitos comportamentais e autonômicos, possivelmente relacionados a comportamentos de ansiedade e medo em roedores [42,52,53]. Entretanto a maior expressão das enzimas antioxidantes, pode ser vista como um mecanismo de compensação para manter a homeostase redox, uma vez que existe um processo fisiológico de aumento das moléculas antioxidantes (não-enzimáticas e enzimáticas), de modo a tentar evitar o dano oxidativo do tecido [54, 55].

O estresse oxidativo ou nitrosativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os radicais livres e a defesa antioxidante, resultando em níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERN) que, podem comprometer lipídios, proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA), ocasionando o dano oxidativo e, eventualmente, a morte celular [41, 56]. Diante disso, podem ser gerados sinais inflamatórios, contribuindo para neuroinflamação, perda de função e por consequência, ocasionar alterações comportamentais [57].

Sabe-se que a quantificação de enzimas antioxidantes é avaliada como uma medida indireta do estresse oxidativo [58]. Desta forma, a atividade aumentada de SOD pode sugerir que os radicais livres, EROS e ERN, poderiam estar presentes na amígdala, mas não causaram dano oxidativo capaz de aumentar marcadores, porém, foram capazes de ativar as enzimas antioxidantes. Na verdade, é reportado na literatura que diante ao estresse oxidativo as células aumentam suas defesas antioxidantes por meio da ativação do fator de transcrição nuclear relacionado ao fator eritróide 2 (Nrf2), que aumenta a expressão de vários antioxidantes endógenos para combater o acúmulo de oxidantes [59].

A menor atividade exploratória dos ratos machos demonstrada no LCE, indicou maiores níveis de ansiedade em relação as fêmeas. Na literatura, estudos relatam que fêmeas tendem a ser menos ansiosas [60, 61, 62], entretanto, o comportamento ansioso apresentado pelos machos, possivelmente ocorreu pelo aumento na produção de testosterona, hormônio produzido nas gônadas masculinas associado diretamente com o aumento da ansiedade [63]. Visto que na adolescência ocorre intensa atuação dos hormônios sexuais circulantes e maturação reprodutiva (puberdade), responsável pela diferenciação sexual, que pode ter ocasionado ganho de peso e

acúmulo de gordura abdominal maior nos machos, esta também representa uma fase importante do neurodesenvolvimento. Desta forma, comportamentos como a ansiedade, são influenciados pela produção hormonal [63, 64, 65].

No presente estudo, o jejum intermitente e a restrição proteico-calórica na lactação, atuaram de formas diferentes no comportamento de ansiedade. Entretanto, é relatado na literatura que dietas restritivas podem impactar no comportamento da prole através de alterações nos cuidados maternos [61]. Este cuidado refere-se ao comportamento desempenhado pela mãe com a finalidade de nutrir e proteger sua ninhada durante seu desenvolvimento inicial [66]. Para roedores os cuidados maternos na lactação consistem em aninhar e manter os filhotes aquecidos, recuperar os filhotes para o ninho, amamentar e lamber os filhotes individualmente [67].

Estudos indicam que dietas restritivas maternas pré e/ou pós-natal podem causar alterações nos cuidados maternos durante a lactação, gerando impactos no perfil comportamental de ansiedade da prole na idade adulta [68, 69, 70,71,72]. Animais que recebem cuidados maternos aprimorados, podem demonstrar menores níveis de ansiedade, enquanto cuidados maternos reduzidos contribuem para maiores níveis do comportamento ansioso [73,74]. Desta forma, além dos possíveis impactos citados anteriormente sobre o desenvolvimento de sistemas neurais que regulam a ansiedade e medo, não podemos desconsiderar os efeitos concomitantes das dietas restritivas na interação mãe-filhote. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar essa hipótese.

Neste estudo, o procedimento de reabilitação nutricional realizado durante 32 dias pós-desmame, não foi suficiente para restaurar o peso corporal dos filhotes que receberam dietas restritivas durante a lactação, corroborando com a literatura [61]. Acredita-se que o peso corporal seja determinado nas fases iniciais da vida (pré e pós-natal), dependendo das condições nutricionais existentes nesses períodos [23,61], desta forma, os impactos nutricionais sofridos persistiram reduzindo o ganho de massa corporal.

Apesar do impacto negativo no peso corporal evidenciado pelo menor ganho de peso e gordura abdominal dos animais J e R na adolescência, a memória de longo prazo permaneceu intacta. Supõe-se que a preservação da memória pode estar relacionada ao tempo de exposição as dietas restritivas, uma vez que os animais tiveram uma exposição precoce de curto prazo e foram testados na adolescência. Entretanto, estudos anteriores que expuseram a prole à restrições alimentares no início da vida, atestaram prejuízos a memória de reconhecimento de objetos e alterações no desenvolvimento encefálico dos animais [22, 23, 75,

76]

Várias regiões do encéfalo coordenam o processo de reconhecimento de objetos [77, 78, 79]. Estudos mostram, que circuitos hipotalâmicos podem estar relacionados na formação da memória de reconhecimentos de objetos, através de neurônios que expressam o neurotransmissor peptídico hormônio concentrador de melanina (MCH) [80,81]. Mesmo não existindo consenso na literatura sobre qual estrutura encefálica possui papel chave no reconhecimento de um novo objeto pelo animal, várias evidências apontam que o hipocampo possui importância fundamental nesse processo [82, 83,84, 85, 86].

Embora no presente estudo não tenha sido avaliado o hipocampo, é importante ressaltar que em roedores tal estrutura se desenvolve ao final do período de lactação, entre o 18 e 20º dia de vida [87], no qual os filhotes já estavam submetidos a restrições através das mães. Dessa forma, era esperado que houvesse alteração na memória de longo prazo dos animais.

Esse estudo é, provavelmente, o primeiro a reportar o uso do jejum intermitente materno durante a fase de lactação, demonstrando que o impacto no peso corporal, persistiu após o processo de reabilitação nutricional e que ocorreram alterações no comportamento de ansiedade da prole na adolescência. Mesmo existindo uma extensa literatura abordando os diversos benefícios da prática de dietas restritivas para saúde e longevidade [88,11,89,90], torna-se necessário mais estudos que abordem qual a extensão dos impactos dessas dietas utilizadas precocemente pelas mães, ainda que em curto prazo, para a saúde de seus filhos ao longo da vida. Além disso, este estudo evidenciou a importância da alimentação materna no período de amamentação para o crescimento e desenvolvimento adequado dos filhos.

Entretanto, algumas limitações foram notadas para o presente estudo. Em primeiro lugar, a dosagem de testosterona nos ratos machos e a fase do ciclo estral nas fêmeas poderia ter sido realizada para melhor entendimento do papel dos hormônios nos comportamentos. Em segundo, a avaliação do estado redox deveria ser realizada no hipocampo, tendo em vista que na literatura essa estrutura encefálica é descrita como fundamental no processo de formação da memória de reconhecimento de objetos [82, 83, 84,85,86]. Além disso, para compreender melhor o papel das dietas restritivas na memória, cognição e aprendizado, outros testes como a memória de curto prazo, labirinto em Y e labirinto aquático de Morris poderiam ser realizados. Finalmente, seria importante avaliar os cuidados maternos, levando em consideração que as dietas restritivas podem alterá-los durante a lactação e impactar no comportamento da prole [68,69,70, 71,72].

5 CONCLUSÕES

O jejum intermitente reduziu a ansiedade e/ou aumentou a impulsividade, enquanto a restrição proteico-calórica aumentou a atividade antioxidante da SOD na amígdala e reduziu no hipotálamo. Os machos foram mais ansiosos e as dietas restritivas (J e R) e o sexo não interferiram na memória de longo prazo dos filhotes adolescentes.

6 REFERÊNCIAS

- [1] S. Parretti, A. Caroli, E. Torlone, Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes, *Front. Endocrinol.* 11(2020) 611929. <<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.611929>>.
- [2] E. Hartley, B. Hill, S. McPhie, H. Skouteris, The associations between depressive and anxiety symptoms, body image, and weight in the first year postpartum: a rapid systematic review, *Journal of Reproductive and Infant Psychology.* 36 (1) (2018) 81-101. <<https://doi.org/10.1080/02646838.2017.1396301>>.
- [3] K. Leahy, K.S. Berlin, G.G. Banks, J. Bachman, The Relationship Between Intuitive Eating and Postpartum Weight Loss, *Matern Child Health J.* 21 (2017) 1591–1597. <<https://doi.org/10.1007/s10995-017-2281-4>>.
- [4] M.E. Lovering, R.F. Rodgers, J.E. George, D.L. Franko, Exploring the Tripartite Influence Model of body dissatisfaction in postpartum women, *Body Image.* 24 (2018) 44-54. <<https://doi.org/10.1016/j.bodyim.2017.12.001>>.
- [5] M.F. Lee, S.L. Williams, K.J. Burke, Striving for the thin ideal post-pregnancy: a cross-sectional study of intuitive eating in postpartum women, *Journal of Reproductive and Infant Psychology* 38 (2) (2020) 127-138. <<https://doi.org/10.1080/02646838.2019.1607968>>.
- [6] G.L. Rodríguez-González, C.J. Bautista, K.I. Rojas-Torres, P.W. Nathanielsz, E. Zambrano, Importance of the lactation period in developmental programming in rodents, *Nutrition Reviews* 78 (S2) (2020) 32-47. <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa041>>.
- [7] A. Amaro, F.I. Baptista, P. Matafome, Programming of future generations during breastfeeding: The intricate relation between metabolic and neurodevelopment disorders, *Life Sciences* 298 (2022) 120526. <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120526>>.
- [8] A.R. Barnosky, K.K. Hoddy, T.G. Unterman, A. Krista, V. Chicago, Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: a review of human findings, *Translational Research: Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 164 (2014) 302-311. <<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.013>>.
- [9] B. Malinowski, K. Zalewska, A. Wesierska, M.M. Sokołowska, M. Socha, G. Liczner, K. Pawlak-Osinska, M. Wicinski, Intermittent Fasting in Cardiovascular Disorders - An Overview, *Nutrients* 11(2019) 673. <<https://doi.org/10.3390/nu11030673>>.

- [10] L.M. Readman, E. Ravussin, Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes, *Antioxidants & Redox Signaling*. Bethesda 15 (14) (2011) 275-87. <<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3253>>.
- [11] N.A. Hanjani, M. Vafa, Protein Restriction, Epigenetic Diet, Intermittent Fasting as New Approaches for Preventing Age-associated Diseases, *Int J Prev Med* 9 (2018) 58. <https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_397_16>.
- [12] S. Jain, S.N. Singh, Calorie Restriction – An Approach towards Obesity Management, *Journal of Nutritional Disorders & Therapy* S1 (2015). <<http://dx.doi.org/10.4172/2161-0509.S1-006>>.
- [13] A. Rocha-Gomes, A.E. Teixeira, D.S.S. Lima, L.S. Rocha, A.A. Silva, M.R. Lessa, N.A.V.D. Pinto, S. R. Stuckert-Seixas, T. R. Riul, Caloric restriction or cafeteria diet from birth to adulthood increases the sensitivity to ephedrine in anxiety and locomotion in Wistar rats, *Physiology & Behavior* 236 (2021) 113430. <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113430>>.
- [14] A.C. Dutra-Tavares, J.O. Silva, A.L. Nunes-Freitas, V.M.S. Guimarães, U.C. Araújo, E.P.S. Conceição, E.G. Moura, P.C. Lisboa, C.C. Filgueiras, A.C. Manhães, Y. Abreu-Villaça, A. Ribeiro-Carvalho, Maternal undernutrition during lactation alters nicotine reward and DOPAC/dopamine ratio in cerebral cortex in adolescent mice, but does not affect nicotine-induced nAChRs upregulation, *International Journal of Developmental Neuroscience* 65 (2018) 45–53. <<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.007>>.
- [15] R.F. Mendes-da-Silva, E.S. Francisco, R.C.A. Guedes, Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: Electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats, *Brain Research Bulletin* 142 (2018) 414-421. <<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.008>>.
- [16] E.J.L. Coley, E.Y. Hsiao, Malnutrition and the microbiome as modifiers of early neurodevelopment, *Trends in Neurosciences* 44 (2021) 753-764. <[HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.TINS.2021.06.004](https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.06.004)>.
- [17] J. Liu, A. Raine, Nutritional status and social behavior in preschool children: the mediating effects of neurocognitive functioning, *Maternal & Child Nutrition* 13 (2016). <<https://doi.org/10.1111/mcn.12321>>.

- [18] M. Chertoff, Protein Malnutrition and Brain Development, *Brain Disorders & Therapy* 4 (3) (2015). < <http://dx.doi.org/10.4172/2168-975X.1000171>>.
- [19] X. Yan, X. Zhao, J. Li, L. He, M. Xu, Effects of early-life malnutrition on neurodevelopment and neuropsychiatric disorders and the potential mechanisms, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 83 (2018) 64-75. <<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.12.016>>.
- [20] M.K. Georgieff, S.E. Ramel, S.E. Cusick, Nutritional influences on brain development, *Acta Paediatrica* 107 (8) (2018) 1310–1321. < <https://doi.org/10.1111/apa.14287>>.
- [21] T.R. Riul, S.S. Almeida, Feed restriction since lactation has reduced anxiety in adult Wistar rats, *Rev Nutr.* 33 (2020) 13. <<https://doi.org/10.1590/1678-9865202033e190143>>.
- [22] C.T. Valadares, M.T.H. Fukuda, A.L. Françolin-Silva, A.S. Hernandez, S.S. Almeida, Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures, *Nutrit. Neurosc.* 13 (2010) 274-282. <<https://doi.org/10.1179/147683010X12611460764769>>.
- [23] N.N. Braga, M.T. H. Fukuda, S.S. Almeida, Early postnatal protein malnutrition impairs recognition memory in rats (*Rattus norvegicus*), *Psychology & Neuroscience* 7 (2) (2014) 103 – 111. < <https://doi.org/10.3922/j.psns.2014.02.01>>.
- [24] M. Khare, C. Mohanty, B.K. Das, A. Jyoti, B. Mukhopadhyay, S.P. Mishra, Free Radicals and Antioxidant Status in Protein Energy Malnutrition, *Hindawi* (2014) 1-6. < <https://doi.org/10.1155/2014/254396>>.
- [25] Triawanti, D.D. Sanyoto, M.S. Noor, The supplementation of pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) in undernourished rats to increase spatial memory through antioxidant mechanism, *Clinical Nutrition Experimental* 33 (2020) 49-59. <<https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2020.08.002>>.
- [26] D.D. Sanyoto, M. S. Noor, T. Triawanti, Potential Combinations of Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), Docosahexaenoic Acid, and Seluang Fish (*Rasboraspp.*) to Improving Oxidative Stress of Rats (*Rattus norvegicus*) Brain Undernutrition, *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 10 (A) (2022) 25-32. < <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.7671>>.

- [27] S. Pellow, P. Chopin, S.E. Arquivo, M. Briley, Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *Journal of Neuroscience Methods*, 14 (3) (1985) 149–167. <[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)>.
- [28] C.R.C. Guedine, L.C.M. Pordeus, T.R. Riul, A.A.J. Júnior, S.S. Almeida, Cafeteria diet during lactation and/or post- lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat offspring, *Nutritional Neuroscience* 23 (7) (2018) 1–11. <<https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1529283>>.
- [29] R.A. Bevins, J. Besheer, Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory', *Nature Protocols* 1 (3) (2006) 1306–1311. <<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>>.
- [30] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248–254. <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)>.
- [31] K. Ulrich, U. Jakob, The role of thiols in antioxidant systems, *Free Radical Biology and Medicine* 140 (20) (2019) 14–27. <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>>.
- [32] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47 (3) (1974) 469–474. <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>>.
- [33] C.S. Melo, E. Rocha-Vieira, D.A. Freitas, B.A. Soares, A.R. Gomes, T.R. Riul, V.A. Mendonça, A.C.R. Lacerda, A.C.R. Camargos, L.E.D. Carvalho, R.A.L. Sousa, H.R. Leite, A single session of high-intensity interval exercise increases antioxidants defenses in the hippocampus of Wistar rats, *Physiology and Behavior*, 211 (1) (2019). <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112675>>.
- [34] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry* 239 (1) (1996) 70–76. <<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>>.
- [35] D.A. Freitas, E. Rocha-Vieira, B.A. Soares, L.F. Nonato, S.R. Fonseca, J.B. Martins, V.A. Mendonça, A.C. Lacerda, A.R. Massensini, J.R. Poortamns, R. Meeusen, H.R. Leite, High

intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats, *Physiology & Behavior* 184 (2018) 6-11. <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.027>>.

[36] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry* 95 (2) (1979) 351–358. <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)>.

[37] C.J. Dorantes-Barrios, E. Domínguez-Salazar, O. Gonzalez-Flores, E.C.es-Barberena, G. Hurtado-Alvarado, *Physiology & Behavior* 241 113566 (2021). <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113566>>.

[38] A.C. Dutra-Tavares, J.O. Silva, A.L. Nunes-Freitas, V.M.S. Guimarães, U.C. Araújo, E.P.S. Conceição, E.G. Moura, P.C. Lisboa, C.C. Filgueiras, A.C. Manhães, Y. Abreu-Villaça, A.Ribeiro-Carvalho, Maternal undernutrition during lactation alters nicotine reward and DOPAC/dopamine ratio in cerebral cortex in adolescent mice, but does not affect nicotine-induced nAChRs upregulation, *International Journal of Developmental Neuroscience* 65 (2018) 45–53. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.007>>.

[39] D.S.C. Lima, E.S. Francisco, C.B. Lima, R.C.A. Guedes, Neonatal L-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression, and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size- and large size litters, *Amino Acids*, 49 (2) (2016). <<https://doi.org/10.1007/s00726-016-2365-2>>.

[40] R.O. Soares, R.C. Rorato, D. Padovan, J.J. Lachat, J. Antunes-Rodrigues, L.L.K. Elias, S.S. Almeida, Environmental enrichment reverses reduction in glucocorticoid receptor expression in the hippocampus of and improves behavioral responses of anxiety in early malnourished rats, *Brain Research* 1600 (2015) 32–41. <<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.047>>.

[41] M.D. Filiou, C. Sandi, Anxiety and Brain Mitochondria: A Bidirectional Crosstalk, *Trends in Neurosciences* 42 (2019) 9. <<https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.07.002>>.

[42] P. Tovote, J.P. Fadok, A. Lüthi, Neuronal circuits for fear and anxiety, *Nature Reviews Neuroscience*, 16 (6) (2015) 317-331. <<https://doi.org/doi:10.1038/nrn3945>>.

- [43] T.L. Gilman, C.M. George, M.A. Andrade, N.C. Mitchell, G. M. Toney, L.C. Daws, High Salt Intake Lowers Behavioral Inhibition, *Front. Behav. Neurosci* 13 (2019). <<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00271>>.
- [44] A. Perez-Conargo, M.J. Ramírez, M.A. Zulet, J.A. Martinez, Effect of dietary restriction on peripheral monoamines and anxiety symptoms in obese subjects with metabolic syndrome, *Psychoneuroendocrinology*, 47(2014)98-106.<<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.05.003>>.
- [45] M. Alamy, W.A. Bengelloun, Malnutrition and brain development: An analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat, *Neuroscience and biobehavioral Reviews* 36 (2012) 1463-1480. < <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.03.009> >.
- [46] R. M. S. Lima, L. V.S. Bento, M. D. M. V. Lugon, V. G. Barauna, A. S. Bittencourt, C. Dalmaz, A. P. S. Vasconcellos Bittencourt. Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides, *Behavioural Brain Research* 379 (2020) 112399. < <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112399>>.
- [47] M.R. Ramis, F. Sarubbo, J. L. Terrasa, D. Moranta, S. Aparicio, A. Miralles, S. Esteban.Chronic α -tocopherol increases central monoamines synthesis and improves cognitive and motor abilities in old rats, *Rejuvenation Research* 19(2) (2016) 159-71. <DOI: 10.1089/rej.2015.1685 >.
- [48] B.M. Lotufo, F. Tenório, P.C. Barradas, P.L. Guedes, S.S. Lima, M. L. Rocha, V.H.D. Pinheiro, V.S.T. Rodrigues, P.C. Lisboa, C.C. Filgueiras, Y.A. Villaça, A.C. Manhães, Maternal protein-free diet during lactation programs male Wistar rat offspring for increased novelty-seeking, locomotor activity, and visuospatial performance, *Behavioral Neuroscience* 132 (2) (2018) 114-127. < <http://dx.doi.org/10.1037/bne0000234> >.
- [49] L. Canever, T.G. Freire, G.A. Mastella, L. Damázio, S. Gomes, I. Fachim, C. Michels, G. Carvalho, A.K. Godoi, B.R. Peterle, F.F. Gava, S.S. Valvassori, J. Budni, J. Quevedo, A.I. Zugno, Changes in Behavioural Parameters, Oxidative Stress and Neurotrophins in the Brain of Adult Offspring Induced to an Animal Model of Schizophrenia: The Effects of FA Deficient or FA Supplemented Diet during the Neurodevelopmental Phase, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 86(2018) 52–64. < <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.014>>.

[50] A.S. Olugbemide, B. Ben-Azu, A.G. Bakre, A.M. Ajavi, O. Femi-Akinlosotu, S. Umukoro, Naringenin Improves Depressive- and Anxiety-like Behaviors in Mice Exposed to Repeated Hypoxic Stress through Inhibition of Oxido- Inflammatory Mediators and NF-KB/BDNF Expressions, *Brain Research Bulletin*, 169 (2021) 214-227. <<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.12.003>>.

[51] T.M. Santos, J. Kolling, C. Siebert, H. Biasibetti, C.G. Bertó, L.K. Grun, C. Dalmaz, F.M. Barbé-Tuana, A.T.S. Wyse, Effects of Previous Physical Exercise to Chronic Stress on Long-Term Aversive Memory and Oxidative Stress in Amygdala and Hippocampus of Rats. *Inter. J. Devl Neuroscience* 56(1) (2017) 58–67. <<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.12.003>>.

[52] S. Ahrens, M.V. Wu, A. Furlan, G.R. Hwang, R. Paik, H. Li, M.A. Penzo, J. Tollkuhn, B. Li, A Central Extended Amygdala Circuit That Modulates Anxiety, *The Journal of Neuroscience*, 38 (24) (2018) 5567–5583. <[https:// DOI:10.1523/JNEUROSCI.0705-18.2018](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0705-18.2018)>.

[53] G.C. Calhoon, K.M. Tye, Resolving the neural circuits of anxiety, *Nature Neuroscience* 18 (10) (2015) 1394–1404. <[https://doi:10.1038/nn.4101](https://doi.org/10.1038/nn.4101) >.

[54] A.E. Teixeira, A. Rocha-Gomes, T.P. Santos, B.L.S. Amaral, A.A. Silva, A.R. Malagutti, F.R.F. Leite, S.R. Stuckert-Seixas, T.R. Riul, Cafeteria diet administered from lactation to adulthood promotes a change in risperidone sensitivity on anxiety, locomotion, memory, and social interaction of Wistar rats, *Physiology & Behavior*, 220 (112874) (2020). <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112874>>.

[55] N. Bakunina, C.M. Pariante, P.A. Zunszain, Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression, *Immunology* 144(3) (2015) 365–373. <<https://doi.org/10.1111/imm.12443> >.

[56] Triawanti, D.D. Sanyoto, M.S. Noor, The supplementation of pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) in undernourished rats to increase spatial memory through antioxidant mechanism, *Clinical Nutrition Experimental* 33 (2020) 49e59. <<https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2020.08.002>>.

[57] P.E.P.T. Leal, A. A. Silva, A. Rocha-Gomes, T.R. Riul, R.A. Cunha, C. Reichetzeder, D. C. Villela, High-Salt Diet in the Pre- and Postweaning Periods Leads to Amygdala Oxidative

Stress and Changes in Locomotion and Anxiety-Like Behaviors of Male Wistar Rats, *Front Behav Neurosci* 15 (2022). <[https://doi: 10.3389/fnbeh.2021.779080](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.779080)>.

[58] M. Koga, A.V. Serritella, A. Sawa, T.W. Sedlak, Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis, *Schizophrenia Research* 176 (2016) 52-71. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.06.022>>.

[59] S. Salim, Oxidative Stress and the Central Nervous System, *JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* Salim, S. (2016). Estresse Oxidativo e Sistema Nervoso 360 (1) (20117). <<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.116.237503>>.

[60] E. Domonkos, V. Borbélyová, M. Csongová, M. Bosý, M. Kačmárová, D. Ostatníková, J. Hodosy, P. Celec, Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats, *Horm Behav.* 93 (2017) 159–165. <<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.05.019>>.

[61] R. Guzman, J. Medina, A.I. Saulsbery, J.L. Workman, Rotated nursing environment with underfeeding: A form of early-life adversity with sex- and age-dependent effects on coping behavior and hippocampal neurogenesis, *Physiology & Behavior* 225 (113106) (2020). <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113106>>.

[62] P. Knight, R. Chellian, R. Wilson, A. Behnood-Rod, S. Panunzio, A.W. Bruijnzeel, Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 204 (2021) 10. <<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173168>>.

[63] E. Domonkos, J. Hodosy, D. Ostatníková, P. Celec, On the Role of Testosterone in Anxiety-Like Behavior Across Life in Experimental Rodents, *Front Endoc.* 9 (2018) 441. <<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00441>>.

[64] K.M. Schulz, H.A. Moleda-Figueira, C.L. Sisk, Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence, *Hormones and Behavior* 55 (2009) 597-604. <<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.010>>.

[65] C.L. Sisk, J.L. Zehr, Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior, *Frontiers in Neuroendocrinology* 26 (2005) 163-174. <<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.003>>.

- [66] R. Orso, K.C. Creutzberg, L.E. Wearick-Silva, T.W. Viola, S.G. Tractenberg, F. Benetti, R.G. Oliveira, How early life stress impact maternal care: a systematic review of rodent studies, *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13 (2019) 197. <doi: 10.3389/fnbeh.2019.00197>.
- [67] S.C. Lauby, A.S. Fleming, P.O. McGowan, Beyond maternal care: The effects of extra-maternal influences within the maternal environment on offspring neurodevelopment and later-life behavior, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 127 (2021) 492-501. <<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.04.021>>.
- [68] T.H. Batista, V.B. Veronesi, A.C.A.F. Ribeiro, A.G. Paiva, F.C. Vilela, Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring, *Nutritional neuroscience*, 20(8) (2016) 437-442. <<http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2016.1177320>>.
- [69] L.M. Belluscio, B.G. Berardino, N.M. Ferroni, J.M. Ceruti, E.T. Cánepa, Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors, *Physiology & behavior*, 129 (2014) 237-254. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.051>>.
- [70] O. Gianatiempo, S.V. Sonzogni, E.A. Fesser, L.M. Belluscio, E. Smucler, M.R. Sued, E.T. Cánepa, Intergenerational transmission of maternal care deficiency and offspring development delay induced by perinatal protein malnutrition, *Nutritional Neuroscience*, 23(5), (2018) 387-397. <<https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1509178>>.
- [71] A. Govic, V. Bell, A. Samuel, J. Penman, A.G. Paolini, Calorie restriction and corticosterone elevation during lactation can each modulate adult male fear and anxiety-like behaviour, *Hormones and behavior*, 66(4) (2014) 591-601. <<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.013>>.
- [72] E.A. Levay, A.G. Paolini, A. Govic, A. Hazi, J. Penman, S. Kent, Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction, *Behavioural brain research*, 191(2) (2008) 164-172. <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.021>>.
- [73] M.M. Calvo, A.S. Cordero, A.M. Gallegos, J.F. Trías, Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague–Dawley rats, *Physiology & behavior*, 118 (2013) 212-217. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.033>>.

- [74] A.S. Cordero, M.M. Calvo, A.M. Gallegos, J.F. Trías, Maternal behavior as an early modulator of neurobehavioral offspring responses by Sprague-Dawley rats, *Behavioural Brain Research*, 237 (2013) 63-70. <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.028>>.
- [75] J.M. Gould, P.J. Smith, C.J. Airey, E.J. Mort, L.E. Airey, F.D. Warricker, J.E.P. Farr, E.C. Westonc, P.J.W. Gouldc, O.G. Semmencec, K.L. Restall, J.A. Watts, P.C. McHugh, S.J. Smith, J.M. Dewing, T.P. Fleming, S.W. Morawek, Mouse maternal protein restriction during preimplantation alone permanently alters brain neuron proportion and adult short-term memory, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(31) (2018) E7398–E7407. <<https://doi.org/10.1073/pnas.1721876115>>.
- [76] P.A.P. Pacagnella, P.M.S.D.A. Parpinelli, J.J. Lachat, The morphological and developmental changes of the anterior commissure of male Wistar rats submitted to protein malnutrition in the postnatal period, *Nutritional neuroscience*, 16(2) (2013) 61-68. <<https://doi.org/10.1179/1476830512Y.0000000031>>.
- [77] G.R.I. Barker, E.C. Warburton, Multi-level analyses of associative recognition memory: the whole is greater than the sum of its parts, *Current Opinion in Behavioral Sciences* 32 (2020) 80–87. <<http://doi:10.1016/j.cobeha.2020.02.004>>.
- [78] R. Han, A. Tian, H. Lin, M. Chang, J. Wei, K. Deng, H. Xin, Nociceptin impairs acquisition of novel object recognition memory in perirhinal cortex, *Neurobiology of Learning and Memory* 162 (2019) 9–14. <<https://doi:10.1016/j.nlm.2019.04.015>>.
- [79] E.C. Warburton, M.W. Brown, Neural circuitry for rat recognition memory, *Behavioural Brain Research* 285 (2015)131–139.,<https://doi:10.1016/j.bbr.2014.09.050>>.
- [80] D. Burdakov, D. Peleg-Raibstein, The hypothalamus as a primary coordinator of memory updating, *Physiology & Behavior*, 223 (2020) 112988. <<https://doi:10.1016/j.physbeh.2020.112988>>.
- [81] C. Kosse, D. Burdakov, Natural hypothalamic circuit dynamics underlying object memorization, *Nature Communications*, 10 (1) (2019).<<https://doi:10.1038/s41467-019-10484-7>>.
- [82] L.M. Allen, R.A. Lesyshyn, S.J. O'Dell, T.A. Allen, N.J. Fortin, The hippocampus, prefrontal cortex, and perirhinal cortex are critical to incidental order memory, *Behavioural Brain Research* (2019) .<<https://doi:10.1016/j.bbr.2019.112215>>.

- [83] C. Balducci, A. Frasca, M. Zotti, P. La Vitola, E. Mhillaj, E. Grigoli, M. Iacobellis, F. Grandi, M. Messa, L. Colombo, M. Molteni, L. Trabace, C. Rossetti, M. Salmona, G. Forloni, Toll-like receptor 4-dependent glial cell activation mediates the impairment in memory establishment induced by β -amyloid oligomers in an acute mouse model of Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60 (2017)188–197. <doi:10.1016/j.bbi.2016.10.012 >.
- [84]M. Kodali, B. Hattiangady, G.A. Shetty, A. Bates, B. Shuai, A.K. Shetty, Curcumin treatment leads to better cognitive and mood function in a model of Gulf War Illness with enhanced neurogenesis, and alleviation of inflammation and mitochondrial dysfunction in the hippocampus, *Brain, Behavior, and Immunity* 69 (2018) 499–514. <https://doi:10.1016/j.bbi.2018.01.009>.
- [85] A. Soch, S. Bradburn, L. Sominsky, S.N. Luca, C. Murgatroyd, S.J. Spencer, Effects of exercise on adolescent and adult hypothalamic and hippocampal neuroinflammation, *Hippocampus* 26 (11) (2016) 1435–1446. <https://doi:10.1002/hipo.22620>.
- [86] J.J. Tuscher, L.R. Taxier, A.M. Fortress, K.M. Frick, Chemogenetic inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, individually and concurrently, impairs object recognition and spatial memory consolidation in female mice, *Neurobiology of Learning and Memory* 56 (2018) 103-116.<https:// doi:10.1016/j.nlm.2018.11.002>.
- [87] D.J. Clancy, Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a *Drosophila* Insulin Receptor Substrate Protein, *Science* 292 (5514) (2001) 104–106. <https://doi:10.1126/science.1057991>.
- [88] S.Nain, A. Jain, K. Kumar, Intermittent Fasting (IF): An Approach to a Healthy body, *Journal of Biological Engineering Research and Review* 7 (2020) 24-32.
- [89] A. Francesco, C. Germanio, M. Bernier, R. Cabo, A time to fast, *Science* 362 (6416), (2018) 770–775. <https://doi:10.1126/science.aau2095>.
- [90] G. López-Lluch, P. Navas, Calorie restriction as an intervention in ageing, *The Journal of Physiology* 594 (8) (2016) 2043-2060. <https://doi:10.1113/jp270543>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambas as dietas restritivas maternas durante a lactação desnutriram os filhotes, causaram prejuízos irreversíveis ao crescimento e desenvolvimento da prole, sem alterar a memória de longo prazo. Enquanto o jejum intermitente reduziu a ansiedade no LCE, a restrição proteico-calórica aumentou a ansiedade no CA.

PHYSIOLOGY AND BEHAVIOR

Guide for Authors

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

Ethics in publishing

Please see our information on Ethics in publishing.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by Crossref Similarity Check and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of Open Science, this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server SSRN once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that

the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to SSRN, please consult the SSRN Terms of Use and FAQs.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the

precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the Sex and Gender Equity in Research (SAGER) guidelines and the SAGER guidelines checklist. These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the resources on this page offer further insight around sex and gender in research studies.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer servisse

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

As part of the submission process your paper may be screened for English language usage and conformity to the guide for authors before it reaches the review stage. This is to ensure the journal's high standards are maintained and the review process is kept to a minimum. Passing this check is not a guarantee that your submission will subsequently proceed to the peer review process, which is a decision to be made at the sole discretion of the journal editor.

If you are asked to revise your manuscript during the review stage please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. The standard deadline for authors to submit the revision is 5 weeks. If you require a time extension to return the revision you should state the reasons for this extension and advise on a more feasible date for returning it.

Submission Address

New submissions for regular issues should be sent to ***Suggesting reviewers***

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential reviewers.

You should not suggest reviewers who are colleagues, or who have co-authored or collaborated with you during the last three years. Editors do not invite reviewers who have potential competing interests with the authors. Further, in order to provide a broad and balanced assessment of the work, and ensure scientific rigor, please suggest diverse candidate reviewers who are located in different countries/regions from the author group. Also consider other diversity attributes e.g. gender, race and ethnicity, career stage, etc. Finally, you should not include existing members of the journal's editorial team, of whom the journal are already aware.

Note: the editor decides whether or not to invite your suggested reviewers.

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

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.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized 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. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. 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

Short Communications

Short communications are limited to 3000 words and are not subdivided. The paper should contain an abstract, main body and references, and contain no more than 4 figures or tables, combined. The abstract is limited to 100 words. A guide to estimating paper length follows: Estimate equivalent number of words for figures/tables/eqns as:

One column wide (7.5 cm) figures/tables: 20 words per cm height

Two columns wide (15 cm) figures/tables: 40 words per cm height

Equations: 20 words for each equation

Short communications will appear at the end of the topical sections in the journal table of contents. Each paper will begin with "Short Communication:" followed by the title.

Subdivision - numbered sections

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.

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.

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 lower-case 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.

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.

Drugs

Proprietary (trademarked) names should be capitalized. The chemical name should precede the trade, popular name, or abbreviation of a drug the first time it occurs.

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.). Please seek permission from individuals before acknowledging them in your article.

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, it is recommended to 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.

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).

Anesthesia

In describing surgical procedures on animals, the type and dosage of the anesthetic agent should be specified. Curarizing agents are not anesthetics; if these were used, evidence must be provided that anesthesia of suitable grade and duration was employed.

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.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

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.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C.,

Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

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.

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: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003

(accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

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.

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).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the Research Elements 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.

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can

be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH

Guide for Authors

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

Ethics in publishing

Please see our information on Ethics in publishing.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures

as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by Crossref Similarity Check and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of Open Science, this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server SSRN once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to SSRN, please consult the SSRN Terms of Use and FAQs.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the Sex and Gender Equity in Research (SAGER) guidelines and the SAGER guidelines checklist. These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation -

however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the resources on this page offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**:

(a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer servisse

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your

article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission Address

<https://www.editorialmanager.com/bbres/default.aspx>

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

Peer review

This journal operates a single anonymized 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. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. 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

Length Of Article

Original Research Articles should not exceed 12,000 words (inclusive of abstract, references, and figure legends).

Short communications should not exceed 3500 words (inclusive of abstract, references, and figure legends) and should not be divided into sections. No more than 25 references and four figures or tables should be included.

Subdivision - numbered sections

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.

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 lower-case 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.

The Abstract should not exceed 250 words

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.

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, it is recommended to include the following sentence:

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

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

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

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, 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 all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- 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. Supply captions separately, not attached to the figure. 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.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

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.

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: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

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

Reference to a dataset:

[dataset]

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

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

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 requires 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. When sharing data in one of these ways, you are expected 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).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the Research Elements page.

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page..

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order

offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.