

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA  
E DO ADOLESCENTE

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO CONSUMO  
DE ALIMENTO PALATÁVEL INDUZIDAS POR  
TRAUMA PRECOCE EM RATAS FÊMEAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TANIA DINIZ MACHADO

Porto Alegre, Brasil

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO CONSUMO  
DE ALIMENTO PALATÁVEL INDUZIDAS POR  
TRAUMA PRECOCE EM RATAS FÊMEAS**

TANIA DINIZ MACHADO

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Pelufo Silveira**  
**Co-orientadora: Isabel Cristina Ribas Werlang**

Porto Alegre, Brasil

2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Diniz Machado, Tania  
Investigação das alterações do consumo de alimento  
palatável induzidas por trauma precoce em ratas fêmeas /  
Tania Diniz Machado. -- 2012.  
97 f.

Orientadora: Patrícia Pelufo Silveira.  
Coorientadora: Isabel Cristina Ribas Werlang.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. ansiedade. 2. estresse fisiológico. 3. comportamento  
alimentar. I. Silveira, Patrícia Pelufo, orient. II.  
Cristina Ribas Werlang, Isabel, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO**  
**ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

12 / 09 / 2012

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Dr<sup>a</sup> Grasielle Clotildes Kincheski  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Clécio Homrich da Silva  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Gisele Gus Manfro  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Luciano e Rosely, ao meu irmão Bruno pelo incentivo constante e por  
compartilharem comigo esta conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos participantes do Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) pelas contribuições para a realização desta pesquisa, pela oportunidade de crescimento profissional e pelo aprendizado.

À professora Vera Lúcia Bosa, por ter me apresentado à minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Pelufo Silveira a quem eu agradeço profundamente por todos ensinamentos, pela confiança e pelo exemplo de profissionalismo, pois, mesmo em licença maternidade, disponibilizou um tempo para me orientar e auxiliar no que foi preciso. Obrigada!

Aos meus colegas do NESCA André, Carla e Daniela, pelos constantes auxílios.

À Roberta Dalle Molle, por todos os ensinamentos e ajuda.

À minha família, pelo apoio. Ao meu namorado Roberto, pelo amor, carinho e companheirismo.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA/HCPA).

Aos órgãos de pesquisa por terem viabilizado este trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, pela oportunidade.

## RESUMO

**Introdução:** Estresse crônico na vida adulta aumenta ansiedade e a utilização do alimento palatável “confortante” (*comfort food*) como forma de inibir sintomas de ansiedade, que parece ser mediado pela alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O objetivo deste trabalho foi verificar se o estresse no período neonatal pode afetar ansiedade, comportamento alimentar e a resposta ao estresse em ratas fêmeas adultas. **Métodos:** A partir do segundo dia de vida, ninhadas de ratos Wistar e suas genitoras foram submetidas à redução de material para confeccionar o ninho (intervenção). Na vida adulta, a ansiedade foi mensurada usando o teste de supressão alimentar pela novidade (NSFT), e a resposta neuroendócrina a 20 minutos de estresse por contenção foi verificada pela mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona e ACTH basal e imediatamente, 20, 40 e 70 minutos após o fim do estresse. Em outro subgrupo de animais, também submetidos à intervenção neonatal, o consumo basal de ração padrão assim como a preferência alimentar por alimento palatável, rico em gordura (34%) e açúcar (20%), foram mensuradas em um sistema computadorizado de consumo alimentar contínuo (BioDaq, Research Diets®) de ratas que receberam somente ração regular e nos animais expostos aos dois tipos de alimento (dieta regular e palatável) durante 30 dias. O ganho peso dos animais foi acompanhado semanalmente. Ao final do tratamento, os níveis de T3 e a gordura abdominal foram mensurados. **Resultados:** As genitoras do grupo intervenção apresentaram cuidado materno com menos variabilidade e menor qualidade quando comparadas às genitoras controles. O estresse na vida precoce aumentou a ansiedade na vida adulta no NSFT teste (latência para comer alimento doce em um novo ambiente ( $p=0.005$ ), diminuiu o consumo de ração ao retornar para caixa-moradia ( $p=0.045$ ), assim como aumentou os níveis de corticosterona em resposta ao estresse agudo por contenção ( $p=0.020$ ). Nenhuma diferença foi encontrada níveis e ACTH em resposta ao estresse ( $p=0,282$ ). O consumo de ração padrão diferiu entre os grupos somente no ciclo escuro, sendo menor no grupo intervenção ( $p=0.047$ ). Ao ser exposto cronicamente à dieta palatável o grupo intervenção neonatal prefere este tipo de alimento quando tem opção de escolha (dieta palatável + dieta regular) ( $p=0.008$ ) diminuindo o consumo de dieta regular. O ganho de peso durante primeiras 72h ( $p=0,417$ ) e ao longo das 4 semanas (0,474) de exposição às dietas não foi diferente entre os grupos, assim como não houve diferença no percentual de gordura abdominal ( $p=0,166$ ). No teste de preferência com todos os grupos, enquanto o grupo controle que recebeu cronicamente dieta palatável demonstrou uma diminuição na preferência por esse tipo de dieta comparado ao grupo controle exposto somente a dieta regular, os animais expostos a estresse precoce não demonstraram redução na preferência após exposição crônica ( $p<0,001$ ). O hormônio T3 na vida adulta correlacionou-se negativamente com ato de lamber os filhotes (LG materno) no grupo intervenção neonatal ( $p=0,010$ ). Essa correlação desaparece quando é dado opção de duas dietas ( $p=0,679$ ). **Conclusão:** Alterações no estado de ansiedade e comportamento alimentar no presente modelo parecem estar relacionadas com mudanças na resposta neuroendócrina do eixo HPA ao estresse agudo. O consumo de alimento palatável possivelmente é utilizado pelas fêmeas do grupo intervenção para inibir os sintomas de ansiedade.

**Palavras-Chave:** Ansiedade, estresse fisiológico, comportamento alimentar.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronic stress in adulthood increases anxiety and prones the individuals to use palatable foods as “comfort foods”, which seems to be mediated by an altered functioning of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA). We aimed at verifying if early life stress also affects anxiety, feeding behavior and stress responses in adult female rats. **Methods:** By the second day of life litters of Wistar rats were subjected to reduced nesting material (Early–Life Stress) or standard care (Controls). In adult life, anxiety was accessed using the novelty suppressed feeding test (NSFT), and the neuroendocrine stress response to 20 minutes restraint stress was verified by measuring plasma corticosterone and ACTH levels at baseline and immediately, 20, 40, and 70 min. following the stress exposure. In a different subset of animals, the basal consumption of regular diet as well as the preference for palatable food (rich in fat (34%) and sugar (20%)) was measured in a continuous monitoring computerized system of food consumption (BioDAQ, Research Diets®) in rats receiving only regular chow or exposed to both regular and hyperpalatable diets continuously for 30 days. Body weight gain was measured weekly. At the end of the treatment, T3 levels and the abdominal fat content were measured.

**Results:** Intervention dams showed decreased variability and quality of maternal care compared to control dams. ELS increased adulthood anxiety in the NSFT (latency to eat the sweet pellet in a new environment  $p=0.005$ , decreased chow consumption upon the return to the homecage  $p=0.045$ ), as well as increased corticosterone levels in response to acute restraint stress ( $p=0.02$ ). No differences were seen in ACTH levels in response to stress. The regular diet intake was different among the groups only during the nocturnal phase of the light cycle, being lower in the intervention group ( $p=0,047$ ). After being exposed chronically to a palatable diet, the intervention group preferred this type of food when having the option to choose (hyperpalatable food + regular diet) ( $p=0,008$ ) decreasing the consumption of the regular diet. The body weight gain during the first 72h ( $p=0,417$ ) and over the 4 weeks of exposure to the palatable diet (0,474) was not different between the groups, as well as no difference was seen on the percentage of abdominal fat ( $p=0,166$ ). On the preference test with all the groups, while the control group chronically exposed to the hyperpalatable diet showed a diminished preference for the palatable food compared to the control group exposed only to the regular diet, the rats exposed to early life stress did not demonstrate this reduction in preference after the chronic exposure ( $p<0.001$ ). T3 hormone levels correlated negatively with the licking and grooming (LG) scores in the ELS group ( $p=0,010$ ). This correlation disappears when is given the oportunity of choice between two diets ( $p=0,679$ ).

**Conclusion:** Alterations in anxiety and feeding behaviors seen in early stressed animals in this model seem to be related to changes in the neuroendocrine HPA response to acute stress. The consumption of palatable food possibly is used by ELS females rats to inhibit the anxiety symptoms.

**Keywords:** Anxiety, physiological stress, feeding behavior.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema mostrando a distribuição das ninhadas nos diferentes experimentos realizados.....	40
Figura 2 - Linha de tempo do procedimento experimental e teste comportamental. ....	41
Figura 3 - Figura do grupo controle neonatal.....	42
Figura 4 - Figura do grupo intervenção neonatal. ....	42
Figura 5- Posturas de amamentação. A linha representa o ventre da genitora visto lateralmente, e os círculos representam os filhotes A) postura 4; B) postura 3; C) postura 2; D) postura 1 e E) postura passiva. ....	46
Figura 6 - Vista frontal da arena utilizada para o teste de Supressão Alimentar pela Novidade (NSFT).....	48
Figura 7 - Vista do BioDaq®. ....	49
Figura 8 - Vista lateral do BioDaq®. ....	50
Figura 9 - Dados do consumo dos animais processados pela central do BioDaq® e emitidos ao computador. ....	50
Figura 10 - Peso corporal, ao longo de 13 semanas de vida, após o desmame, nas fêmeas controle (n=10), fêmeas intervenção (n=20). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou interação entre tempo e grupo neonatal ( $p<0,0001$ ) e efeito do tempo ( $p<0,0001$ ). ....	56
Figura 11 - Latência para o consumo de Froot Loops no teste de supressão alimentar pela novidade. Fêmeas controle (n=10) intervenção (n=20). Dados expressos em média ± EP. Teste t de <i>Student</i> demonstrou diferença no tempo médio de latência entre os grupos ( $p=0,005$ ). ....	57

Figura 12 - Consumo de ração padrão no teste de supressão alimentar pela novidade. Fêmeas controle (n=11) intervenção (n=17). Dados expressos em média ± EP. Teste t de <i>Student</i> demonstrou diferença no consumo de ração entre os grupos (p=0,045). .....	57
Figura 13 –Consumo de ração padrão (últimos 4 dias) no BioDAQ®. ANOVA de medidas repetidas; grupos controle (n=5) e intervenção (n=13) no dia 4; nos dias seguintes controle (n=9) intervenção (n=20) valores expressos em média ± EP; Não houve interação entre tempo e grupo neonatal (p=0,0898).....	59
Figura 14 - Curva de corticosterona em resposta ao estresse em fêmeas controle (n=8) e fêmeas intervenção (n=8). A barra escura no eixo X representa o tempo de exposição ao estresse por contenção de movimentos. Dados expressos em média ± EP. ....	60
Figura 15 - Curva de ACTH em resposta ao estresse nos tempos 0, 20, 40, 60 e 90 minutos em fêmeas controle (n=5-8) e fêmeas intervenção (n=4-8). A barra escura no eixo X representa o tempo de exposição ao estresse por contenção de movimentos. Dados expressos em média ± EP.....	61
Figura 16 - Peso dos grupos ao longo de 72h após o início das novas dietas. Grupo controle DR e 2D n=5, intervenção DR e 2D n=10; Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeito do grupo neonatal (p=0,003), sem outros efeitos. (DR= dieta regular, 2D= dieta regular + dieta palatável, 0= dia do início das novas dietas).....	62
Figura 17 - Peso dos grupos ao longo de 4 semanas após o início das novas dietas. Grupo controle DR e 2D n=5, intervenção DR e 2D n=10; Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do grupo (p=0,0017), sem outros efeitos. DR= dieta regular, 2D= dieta regular + dieta palatável. ....	63
Figura 18 - Consumo de ração padrão entre os grupos ao longo de 4 semanas após o início das novas dietas. Grupo controle DR e 2D n=5, intervenção DR e 2D n=10. Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou interação entre tempo e grupo dieta	

( $p=0,008$ ), efeito do grupo neonatal ( $p=0,026$ ) e do grupo dieta ( $p<0,0001$ ) (DR= dieta regular, 2D= dieta regular + dieta palatável)..... 64

Figura 19 - Percentual de calorias de dieta palatável durante as semanas entre os grupos com duas opções de dietas. Grupo controle  $n=5$ , intervenção  $n=9$ . Dados expressos em média  $\pm$  EP. ANOVA de medidas repetidas demonstrou interação do tempo e grupo neonatal ( $p=0,008$ ), efeito do grupo neonatal ( $p=0,006$ ), tempo ( $p=0,016$ ). 2D= dieta regular + dieta palatável..... 65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre as médias das variáveis relacionadas com o cuidado materno..	55
Tabela 2 - Comparação entre as médias de consumo de ração padrão durante os três dias de habituação ao BioDaq®.....	58
Tabela 3 - Caracterização do consumo de ração padrão basal no BioDaq®.....	60
Tabela 4 - Percentual de dieta palatável consumida durante o Teste de Preferência alimentar por 24h no BioDaq®. ....	65
Tabela 5 - Percentual de gordura abdominal, conforme grupo neonatal e dieta. ....	66
Tabela 6 - Correlação entre LG e T3 nos grupos neonatais com ração padrão Nuvilab®. ....	67
Tabela 7 - Correlação entre LG e T3 nos grupos dietas. ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPc	AMP cíclico
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CRF	Fator liberador de corticotrofina
DA	Dopamina
DEBQ	Questionário de comportamento alimentar Holandes
DSSI	<i>Diagnostics and Statitical Manual of Mental Disorders</i>
D2	Receptor de dopamina do tipo 2
GABA	Ácido $\gamma$ aminobutirico
GR	Receptores glicocorticóides
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPT	Hipotálamo pituitária tireóide
HT	Hormônios da Tireoide
LG	<i>Licking and grooming</i> – lambar os filhotes
mRNA	RNA mensageiro
NGFI-A	Fator de Crescimento do Nervo Induzível pelo Fator A
NPY	Neuropetídeo Y
NSFT	Teste de supressão alimentar pela novidade
NESCA	Núcleo em Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente
PFC	Córtex pré frontal
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo

POMC	Proopiomelanocortina
Rpm	rotações por minuto
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
UEA	Unidade de Experimentação Animal
VTA	Área tegumentar ventral
VO2	Consumo de oxigênio
5-HT	Serotonina
5-HT1A	Receptor de serotonina tipo 1 <sup>a</sup>
5-HT7	Receptor de serotonina do tipo 7
UEA	Unidade de Experimentação Animal

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA) .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 CONSEQUÊNCIAS DO TRAUMA E ESTRESSE .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 EIXO HIPOTÁLAMO – PITUITÁRIA – TIREOIDE (HPT).....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 ANSIEDADE.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 ALIMENTOS CONFORTANTES OU “COMFORT FOODS”.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 O PAPEL DA RELAÇÃO MÃE FILHOTE.....</b>	<b>33</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>36</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>37</b>
<b>5 HIPÓTESE.....</b>	<b>38</b>
<b>6 METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
<b>6.1 ESTUDO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1.1 Animais .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1.2 Grupos Neonatal .....</b>	<b>41</b>
<b>6.1.3 Observações do cuidado materno .....</b>	<b>43</b>
<b>6.1.4 Avaliação do ganho de peso corporal .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1.5 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1.6 Teste de supressão alimentar pela novidade (NSFT) .....</b>	<b>47</b>
<b>6.1.7 Consumo alimentar de ração padrão- BioDaq® .....</b>	<b>48</b>
<b>6.1.8 Subdivisão dos grupos neonatais em diferentes dietas.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1.9 Teste de Preferência Alimentar - BioDaq®.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1.10 Avaliação do ciclo estral das fêmeas .....</b>	<b>52</b>
<b>6.1.11 Coleta e armazenamento de tecidos .....</b>	<b>52</b>
<b>6.1.12 Análises bioquímicas .....</b>	<b>52</b>
<b>6.2 ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>53</b>
<b>6.2.1 Animais .....</b>	<b>53</b>
<b>6.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>53</b>
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>7.1 GRUPOS CONTROLE E INTERVENÇÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7.1.1 Cuidado materno .....</b>	<b>54</b>

7.1.2	Peso ao longo das primeiras 13 semanas após o desmame .....	55
7.1.3	Teste de supressão alimentar pela novidade (NSFT) .....	56
7.1.4	Perfil de consumo alimentar de ração padrão - BioDaq® .....	57
7.1.5	Caracterização do consumo de ração padrão basal no BioDaq® .....	59
7.1.6	Resposta neuroendócrina ao estresse por contenção .....	60
7.2	<b>DIVISÃO DOS GRUPOS CONTROLE E INTERVENÇÃO NOS SUBGRUPOS DE DIETA REGULAR OU DIETA REGULAR + RAÇÃO PALATÁVEL .....</b>	<b>61</b>
7.2.1	Peso corporal dos animais ao longo de 72h após início dietas .....	61
7.2.2	Peso ao longo de 4 semanas após início das dietas .....	62
7.2.3	Resultados dos consumos de ração entre os grupos .....	63
7.2.3.1	Consumo de ração padrão ao longo de 4 semanas após inícios das dietas .....	63
7.2.3.2	Percentual do consumo de dieta palatável ao longo das 4 semanas .....	64
7.2.3.3	Consumo no Teste de Preferência Alimentar .....	65
7.3	<b>Gordura abdominal .....</b>	<b>66</b>
7.4	<b>Resultados preliminares da relação entre o cuidado materno e hormônios da tireóide na vida adulta entre os grupos .....</b>	<b>66</b>
8	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
9	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
10	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>
11	<b>INFORMAÇÕES SOBRE ARTIGO SUBMETIDO .....</b>	<b>97</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O estresse pode ser definido como uma resposta adaptativa do organismo a um estímulo aversivo (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003). O cérebro tem importante papel em resposta a um evento estressor, pois regula diversas funções inclusive respostas comportamentais. Graves insultos podem causar danos permanentes nos neurônios, assim como estressores severos que se prolongam por muito tempo (MCEWEN, 2009).

O período inicial da vida é de alta vulnerabilidade, desse modo, insultos neste período podem levar a agravos que persistem na vida adulta. Mulheres e homens que sofreram abuso sexual na infância têm maiores chances de apresentar transtornos de ansiedade, dependência de drogas e comportamento anti-social na vida adulta. Os homens apresentam maiores sintomas de depressão e uso de drogas ilícitas, enquanto nas mulheres o trauma do abuso sexual se correlaciona com todas as desordens psiquiátricas, demonstrando que a associação entre abuso na infância e psicopatologias varia de acordo com o gênero (MACMILLAN *et al.*, 2001).

Estudos experimentais sugerem que as fêmeas são mais susceptíveis ao estresse do que os machos (KROLOW *et al.*, 2010; BANGASSER *et al.*, 2010). Quando um alimento palatável é oferecido continuamente concomitantemente com estresse crônico, ocorre uma diminuição nas medidas comportamentais de ansiedade em ratas fêmeas (KROLOW *et al.*, 2010). No início dos anos 2000, Dallman e colaboradores propuseram a teoria de que o estresse crônico na vida adulta induz o consumo de *comfort foods*<sup>1</sup> possivelmente ativando mecanismos que tendem a diminuir a atividade do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA), atenuando a resposta ao estresse (DALLMAN *et al.*, 2003; ADAM e EPEL, 2007). O cérebro então “aprenderia” a aliviar o estresse através da alimentação palatável, usando alimentos

---

<sup>1</sup> Alimento calórico rico em gordura e açúcar altamente palatável que induz à sensação de prazer/conforto.

confortantes (“*comfort foods*”), induzindo a obesidade a longo prazo (DALLMAN, 2010). Além das inúmeras evidências experimentais produzidas por seu grupo de pesquisa e outros, também alguns estudos em humanos sugerem que a resposta ao estresse em adultos está relacionada com o uso de “*comfort foods*” (EPEL *et al.*, 2001; TOMIYAMA *et al.*, 2011).

Neste contexto, é importante estudar a relação entre o estresse na vida precoce e suas repercussões sobre a resposta ao estresse e o potencial impacto dessas relações sobre o comportamento alimentar na vida adulta. A maioria das pesquisas com animais utiliza machos em seus experimentos, porém as fêmeas carregam a importante tarefa de perpetuação da espécie através da capacidade de gerar filhotes. Portanto, é relevante salientar que insultos durante o período inicial da vida, caracterizado por alta plasticidade, podem levar a desfechos não favoráveis ao longo da vida, os quais podem ser transmitidos para as gerações seguintes (efeito transgeracional) através de mecanismos adaptativos e epigenéticos.

Desse modo, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da exposição ao ambiente perinatal hostil sobre o consumo de alimentos palatáveis e o ganho de peso em ratas fêmeas adultas, assim como avaliar o possível envolvimento dos eixos hipotálamo hipófise adrenal (HPA) e hipotálamo pituitária tireóide (HPT) nesses efeitos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA)

O eixo HPA é um dos sistemas responsáveis pela resposta ao estresse. Estímulos ameaçadores são captados pelos sistemas sensoriais e induzem a produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Movimentos excitatórios ou inibitórios dos neurônios ali localizados enviam sinais para glândula pituitária (HERMAN *et al.*, 2003), que libera adrenocorticotrofina (ACTH) na corrente sanguínea, que é responsável por estimular a liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal. A resposta imediata do organismo frente ao estresse envolve transmissão desses estímulos diretamente ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) por ação das catecolaminas. Em contrapartida, quando há necessidade da interpretação do cérebro frente a esse estímulo, o sistema límbico inibe a atividade do eixo HPA através da modulação GABAérgica no núcleo paraventricular do hipotálamo (HERMAN e CULLINAN, 1997). Esses sistemas integram uma fina regulação do eixo HPA, e a alteração/modificação dessa capacidade regulatória pode ser a base de muitos transtornos relacionados ao estresse. A atividade gabaérgica no PVN regular diversas funções fisiológicas envolvidas na homeostasia como o estado energético (exemplo núcleo arqueado), temperatura corporal (exemplo área pré-óptica medial), cardiovascular (exemplo núcleo dorsomedial do hipotálamo) e circadiano (exemplo núcleos subparaventricular e dorsomedial do hipotálamo) (CULLINAN *et al.*, 2008).

O estresse agudo induz a secreção de glicocorticóides (que aumentam a motivação para o alimento) assim como de insulina (que ajuda a promover a ingestão de alimentos e a obesidade) (DALLMAN, 2010). A exposição crônica aos glicocorticóides atua de três maneiras mutuamente: (1) aumenta as concentrações de CRH no núcleo central da amígdala,

(2) aguça a vontade de realizar atividades prazerosas, tais como ingestão de alimentos ricos em gordura e açúcar, (3) age aumentando os depósitos de gordura abdominal. Desse modo, permite o aumento da sinalização de reservas energéticas pela produção de citocinas/hormônios pelo tecido adiposo da região abdominal e a inibição da ação de catecolaminas no tronco cerebral e produção de CRH pelos neurônios hipotálamicos. Em ratos, normalmente o estresse crônico (e conseqüentemente altas concentrações de glicocorticóides), combinado com a ingestão unicamente de ração padrão, leva à diminuição do peso corporal. No entanto, com a disponibilização de “*comfort-foods*”, ocorre o aumento do consumo desse tipo de alimento, conseqüentemente, também do peso corporal, como forma de reduzir resposta ao estresse (DALLMAN *et al.*, 2003). Com a ativação destes circuitos, os glicocorticóides podem prejudicar o organismo levando a danos físicos como: obesidade abdominal, prejuízo no ganho de peso, diabetes tipo II, aumento da morbidade e mortalidade (DALLMAN *et al.*, 2004).

Em roedores e em humanos, existe um período hiporesponsivo caracterizado por uma resposta reduzida frente ao estresse que parece estar relacionado com a imaturidade do eixo HPA nas primeiras duas semanas de vida (YOSHIMURA *et al.*, 2003; SAPOLSKY e MEANEY 1986). O controle de retroalimentação negativa na pituitária e a inibição do CRH (resultante da capacidade de resposta) participam deste processo (HALASZ *et al.*, 1997(18)).

Os glicocorticóides maternos estão elevados no final da gestação, como parte do próprio mecanismo do parto. Um estudo interessante realizou adrenalectomia em ratas no 8º dia de gestação, o que resultou em aumento nos níveis de mRNA hipotalâmico para CRH e GR no dia 14 de vida dos filhotes do sexo feminino, sem aumento da proopiomelanocortina (POMC) na pituitária dessas fêmeas. Não houve efeitos da adrenalectomia materna sobre a expressão de genes nos machos (HALASZ *et al.*, 1997), o que demonstra que há um

dismorfismo sexual na influência dos glicocorticóides maternos sobre a expressão de CRH dos filhotes nesse período.

Em humanos, um outro estudo avaliou os níveis de cortisol em homens e mulheres, considerando a variação hormonal das mesmas, em situação de estresse psicológico de falar em público. Era permitido receber apoio de um desconhecido, ou do parceiro(a)/namorado (a), ou nenhum apoio. Diferentemente dos homens, as mulheres apresentaram comportamento peculiar com aumento do cortisol, mesmo quando confortadas por seus parceiros no momento do teste. Isso sugere que respostas diferentes frente ao evento estressor são sexo-específicas (KIRSCHBAUM *et al.*, 1995). Não existe um consenso sobre impacto do estrógeno e da progesterona na regulação neuronal da liberação de CRH, embora se saiba que o estradiol leva a uma “*downregulation*” do CRH, diminuindo o ACTH e tem possíveis efeitos estimulantes na adrenal, o que sugere que os esteróides femininos influenciem em todos os aspectos do funcionamento do eixo HPA (HERMAN *et al.*, 2007).

## 2.2 CONSEQUÊNCIAS DO TRAUMA E ESTRESSE

O fator estressor pode ser algo real ou não, afetando o estado fisiológico ou psicológico do indivíduo. Quando o estresse “obriga” o organismo a funcionar além da sua capacidade e/ ou há dano físico, é denominado trauma. A resposta do organismo de ordem fisiológica frente ao estresse envolve ação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), levando ao aumento do fluxo sanguíneo em diversos órgãos, assim como liberação de catecolaminas, (do sistema nervoso) e glicocorticóides (do córtex da adrenal) (MCEWEN, 2009). A perturbação do estado de equilíbrio vai culminar com uma resposta periférica e comportamental, visando manter a homeostase e aumentar as chances de sobrevivência (TSIGOS e CHROUSOS, 2006). O estresse no período inicial da vida, como maus-tratos

(abusos físicos, sexuais, emocionais e a negligência) na infância, leva a alterações eixo HPA modulando padrões de comportamento que podem persistir durante a vida adulta, tanto em humanos (MELLO *et al.*, 2009; MACMILLAN *et al.*, 2001; TRICKETT *et al.*, 2010; DESANTIS *et al.*, 2011) quanto em roedores (LIU *et al.*, 2000; HALTMEYER *et al.*, 1967; LEVINE *et al.*, 1966; PLOTSKY *et al.*, 2005).

Os hormônios do estresse regulam atividades cerebrais através de mudanças nas estruturas dos neurônios, a fim de proteger o cérebro contra danos permanentes (MCEWEN, 2009). Experiências traumáticas ou estressantes relacionadas a variações na qualidade do cuidado materno no período inicial da vida afetam estruturas neuronais no hipocampo, prejudicando o aprendizado e a memória, enquanto que experiências positivas se associam a melhor desenvolvimento cognitivo da criança (MCCLELLAND *et al.*, 2011). O estresse durante a infância tem sido associado com doenças psiquiátricas na vida adulta tais como depressão maior e transtorno de personalidade (WEBER *et al.*, 2008). Em mulheres na idade adulta, a depressão maior diagnosticada através do DSM-IV (*Diagnosics and Statistical Manual of Mental Disorders- Fourth edition*), está associada tanto ao estresse crônico quanto ao agudo (HAMMEN *et al.*, 2009). Em homens, intensas reações emocionais na vida adulta parecem ter relação com adversidades vivenciadas na infância e maiores chances de desenvolver transtornos de ansiedade (MCLAUGHLIN *et al.*, 2010).

Em estudos experimentais, a manipulação neonatal por curtos períodos durante as primeiras semanas de vida de ratos leva à maior exploração ambiental e a menores níveis de corticosterona, assim como menor expressão comportamental de ansiedade em machos na vida adulta (LEVINE 1967; LIU *et al.*, 2000). Além disso, a manipulação neonatal leva à preferência por alimento doce (SILVEIRA *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2010) com efeitos metabólicos distintos de acordo com o sexo (BENETTI, *et al.*, 2007). Os hormônios tireoideanos e a serotonina parecem mediar expressão de receptores de glicocorticóides em

determinadas regiões do cérebro (hipocampo e córtex) em situações como na manipulação ou estimulação neonatais (SMYTHE *et al.*, 1994; HELLSTROM *et al.*, 2012).

Por outro lado, a separação materna por longos períodos, durante a vida precoce, leva a estado de ansiedade/depressão na vida adulta com diminuição da atividade do sistema serotoninérgico no hipocampo e núcleo da rafe (JAHNG, 2011). Em camundongos, a separação materna de três horas, combinada com estresse materno por contenção nas duas primeiras semanas de vida, leva a alterações de memória presentes nas duas gerações seguintes. Este efeito parece envolver o sistema serotoninérgico, pois a expressão do receptor 5HT1 no núcleo dorsal da rafe é reduzida e encontra-se níveis aumentados de serotonina na área de projeção dorsal da rafe (FRANKLIN *et al.*, 2011). Situações que envolvem breve tensão social ativam o circuito: área tegumentar ventral (VTA) – núcleo accumbens – córtex pré-frontal (PFC) – amígdala, envolvendo o sistema dopaminérgico. Em situações de estresse incontrolável, o circuito neuronal rafe – PFC – hipocampo é ativado (MICZEK *et al.*, 2008).

Na tentativa de compreender mecanismos envolvidos nas situações de abuso e negligência, um estudo utilizou modelo animal de comportamento materno alterado em ratos através da redução do material disponível para construir o ninho. Isso prejudica a relação mãe-filhote, resulta em menor frequência no ato de lambe os filhotes (*licking and grooming-LG*) (IVY *et al.*, 2008), ocasionando alterações do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA) dos filhotes (AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001; BRUNSON *et al.*, 2005; RICE *et al.*, 2008). Em nosso grupo de pesquisa, utilizando este mesmo modelo experimental, foi demonstrado que a exposição a um ambiente perinatal hostil está associada com maior ansiedade (DALLE MOLLE *et al.*, 2012) e maior consumo de alimento doce em ratas fêmeas na vida adulta, apesar de menor consumo de ração padrão (MOLLE, 2011).

Em humanos, o baixo peso ao nascer pode ser considerado como um estressor metabólico que ocorre num período crítico do desenvolvimento. Estudos em crianças (7-9

anos), demonstram que quanto menor o peso de nascimento em meninos, maior eram os níveis de cortisol na resposta ao estresse (frente ao estresse psicológico provocado), o que não ocorreu com as meninas (JONES *et al.*, 2006).

Tanto estudos clínicos quanto experimentais demonstram que insultos no período inicial da vida, através da interação com fatores ambientais e nutricionais, podem programar a preferência alimentar ao longo da vida aumentando a ingestão de determinados alimentos, colaborando para o aparecimento de doenças crônicas. Além disso, a dieta materna, desde a gestação, parece programar o comportamento alimentar da prole (PORTELLA *et al.*, 2012). É interessante notar que o perfil de desfechos na vida adulta relacionado aos eventos perinatais é diferente entre os sexos (DESANTIS *et al.*, 2011; MACMILLAN *et al.*, 2001). Da mesma forma, nem todos que vivenciam eventos estressantes irão desenvolver patologias, porém, para aqueles que são vulneráveis ao estresse, este fator pode auxiliar no desenvolvimento de doenças (TSANKOVA *et al.*, 2007).

### 2.3 EIXO HIPOTÁLAMO – PITUITÁRIA – TIREOIDE (HPT)

Os níveis de hormônios tireoideanos resultam de um complexo mecanismo fisiológico de liberação e ação tecidual, combinado com mecanismos de retroalimentação negativa. Basicamente, o TRH (hormônio liberador de tireotrofina) é secretado pelo hipotálamo, atingindo a adeno-hipófise através do sistema porta-hipofisário, onde se liga a receptores de membrana e estimula a secreção do TSH (hormônio tireoestimulante). O TSH é liberado na corrente sanguínea e se liga a receptores de membrana na glândula tireóide, estimulando a secreção de triiodotirosina (T3) e tiroxina (T4). Estes hormônios são liberados na circulação periférica e agem em receptores nucleares nas células-alvo, o que estimula o metabolismo celular. O T3 é a principal molécula de retroalimentação negativa, agindo a nível



hipotalâmico e hipofisário. O hormônio da tireóide está envolvido no crescimento, desenvolvimento, metabolismo e diferenciação celular, relacionando-se com a produção de ATP. Em especial o T3 está intimamente ligado com a atividade mitocondrial (WRUTNIAK-CABELLO *et al.*, 2001).

A ativação dos hormônios da tireóide parece ocorrer através da ação de genes que codificam as enzimas responsáveis pelo metabolismo de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas), o que pode culminar em um funcionamento alterado da tireóide e influenciar na manutenção da temperatura corporal (NUNES, 2003).

Em ratos, os hormônios da tireóide (TH) têm papel importante no desenvolvimento cerebral, proporcionando sinais que conduzem à diferenciação e maturação. Insultos em períodos críticos do desenvolvimento levam a uma assincronia dos processos fisiológicos, podendo culminar com resultados danosos. Existe um período crítico ou “janela” onde o TH é recrutado para o desenvolvimento normal do cérebro (ANDERSON *et al.*, 2003).

Em mamíferos, durante o desenvolvimento fetal, os hormônios tireoideanos que atuam no cérebro são controlados tanto pela tireóide fetal quanto pelo transporte materno. O metabolismo destes hormônios é finamente regulado, resultando em níveis necessários de T3 e T4 no organismo (ANDERSON *et al.*, 2003). As enzimas denominadas desiodases realizam a conversão de T4 em T3. Existem dois tipos: a desiodase tipo I que é encontrada em tecidos periféricos como o fígado e rim e a desiodases tipo II, com maior afinidade por T4 e encontrada na glândula pituitária, no cérebro e no tecido marrom, contribuindo no processo de conversão tanto dentro da célula como periféricamente (JANSEN *et al.*, 2005).

Insultos na vida precoce desencadeiam alterações no TSH. É interessante notar que alterações do neurodesenvolvimento podem ter relação com hormônios da tireóide. A exposição à nicotina durante a lactação de ratos leva ao hipotireoidismo neonatal que pode ser revertido após a retirada de nicotina (OLIVEIRA *et al.*, 2011). O hipotireoidismo induzido

com o uso de inibidores de T3 e T4 durante a gestação e lactação produz efeitos inibitórios sobre a acetilcolina e ações excitatórias do GABA em diferentes regiões cerebrais, e efeitos contrários são encontrados no hipertireoidismo (AHMED *et al.*, 2010). O uso de um agonista da dopamina em fêmeas lactantes suprime a ação da prolactina no final da lactação, levando a níveis séricos menores de TSH, T3, tiroxina e D2 na pituitária da prole. É interessante notar que a prolactina no final da lactação pode regular o eixo HPT (BONOMO *et al.*, 2008).

Situações que envolvem a exposição ao frio desencadeiam efeitos distintos no eixo HPT dependendo do tempo da exposição (FREGLY, 1989). Quando a mãe sai do ninho, os filhotes são expostos naturalmente a uma temperatura inferior. Submetidos ao estresse por frio, filhotes de ratos pré-obesos Zucker, tiveram a taxa de consumo de oxigênio avaliado no segundo, terceiro e sexto dia após o nascimento, assim como a capacidade de manter a temperatura corporal. Com a diminuição da temperatura ambiente, há um aumento do VO<sub>2</sub> e diminuição na temperatura retal dos animais (BERCE *et al.*, 1986). Estudos demonstraram que esse tipo de estresse, durante quatorze semanas após o nascimento, pode resultar em menor crescimento corporal, assim como aumento da capacidade termogênica. Isso leva ao aumento da taxa metabólica de ratos com um mês de idade (SANT'ANNA e MORTOLA *et al.*, 2003).

Estudos envolvendo o hormônio estimulante da tireoide (TSH) em suínos demonstraram a influência da temperatura na secreção de TSH, sugerindo que a exposição ao calor poderia levar à inibição da secreção desse hormônio (MATTERI e BECKER, 1994). Já em resposta ao estímulo pelo frio, parece ocorrer aumento da secreção de hormônio liberador de tireotrofina (TRH) que leva ao aumento de TSH. Esse mecanismo parece atingir o cérebro e hipotálamo, possivelmente, envolvendo a serotonina e catecolaminas neste processo (FREGLY, 1989).

Em ratos, alterações comportamentais estão associadas com disfunções da tireóide na vida adulta, levando ao acúmulo cerebral de 5-HT e dopamina. No hipertireoidismo, a serotonina encontra-se aumentada na ponte e medula. Já, no hipotireoidismo, as monoaminas são diminuídas nos hemisférios cerebrais e mesodiencefalo (ITO *et al.*, 1977). Diferenças individuais no eixo HPT podem prever comportamento exploratório de ratos machos no teste de campo aberto. Os níveis de T4 se correlacionam positivamente com o comportamento exploratório do animal (HELMREICH e TYLEE, 2011).

Variações neuroendócrinas tanto no eixo HPT quanto no HPA, estão relacionadas com depressão. Além disso, disfunções em ambos os eixos compreendem sintomas de retardo mental (MIN *et al.*, 2012). A diminuição de serotonina parece estar envolvida com níveis de T3 e da prolactina. Pacientes com desordens psiquiátricas que já tentaram suicídio apresentam menores níveis de T3 plasmático e as mulheres menores níveis de prolactina (POMPILI *et al.*, 2012). No entanto, outros estudos reportam que esses pacientes têm menores níveis basais de T4 e TSH com níveis normais de T3 (DUVAL *et al.*, 2010). Estudos experimentais em roedores demonstram que o estresse por choque resulta em diminuição dos níveis de T3 após a exposição ao estresse (HELMREICH *et al.*, 2006).

## 2.4 ANSIEDADE

O desenvolvimento do transtorno de ansiedade é atribuído à ação conjunta de fatores genéticos, ambientais e epigenéticos (NOLTE *et al.*, 2011). A ansiedade compõe a ativação do sistema neuroendócrino e autônomo, culminando com excitação e mudanças nos padrões de comportamento de defesa frente à ameaça (STEIMER, 2002). Há evidências de que o estado de ansiedade pode atuar de forma negativa em doenças tais como asma, doenças autoimunes, câncer, doenças cardiovasculares e obesidade (BALON, 2006).

Em animais a ansiedade é inferida através de comportamentos defensivos e evitativos em diferentes tarefas. Uma vez que esses comportamentos são revertidos por benzodiazepínicos as ações exibidas frente a essas situações são consideradas em roedores estado/comportamento do tipo ansioso (BOUFLEUR *et al.*, 2012; STEIMER *et al.*, 2011).

As ameaças ou o dano potencial elicitam várias alterações comportamentais e neuroquímicas que podem ter um significado adaptativo (SAPOLSKY *et al.*, 2000). Adicionalmente, estes estressores promovem ansiedade, caracterizada por um aumento na atividade do sistema nervoso autônomo, inibição comportamental, aumento da vigilância e atividade de escaneamento e elevada reatividade comportamental (BLANCHARD e BLANCHARD, 1989; BLANCHARD *et al.*, 2011(a); BLANCHARD *et al.*, 2001(b); BLANCHARD *et al.*, 2001(c); BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Para delinear os mecanismos envolvidos nos estados de ansiedade, vários paradigmas foram desenvolvidos. Eles variam desde testes que medem as respostas comportamentais a estímulos neurogênicos ou dolorosos (ex.: níveis de atividade após choque nas patas, imobilização, exposição ao frio, resposta a estímulo acústico intenso) ou a dicas que tenham previamente sido associadas a estímulos dolorosos (ex.: resposta emocional condicionada, medo condicionado), até paradigmas que envolvem estressores psicogênicos (ex.: latência e exploração no campo aberto, claro-escuro, labirinto em cruz elevado, testes de interação social) (BLANCHARD *et al.*, 2001(b), BELZUNG e GRIEBEL, 2001; DAVIS, 1998; FILE, 1990; FILE, 1996).

Comportamentos relacionados à ansiedade e os correlatos neuroquímicos desses comportamentos são dependentes das características específicas da situação do teste. Por exemplo, a ansiedade pode ser ligada ao estímulo (ou ao contexto) ou independente do estímulo externo (BLANCHARD *et al.*, 2001(c); DAVIS, 1998). Além disso, a ansiedade pode ser associada a patologias relacionadas a estressores (ex.: estresse agudo, transtorno do estresse pós-traumático), co-mórbida com outros estados psicológicos (ex.: depressão), ou

pode refletir tanto estado como traço ansioso BELZUNG e GRIEBEL, 2001. Assim, a ansiedade deve envolver diversos circuitos neuronais, diferentemente ativados em função do estressor ou das condições do teste (DAVIS, 1998). Considerando isto, o uso de diferentes paradigmas pode ser útil na verificação de estados relacionados à ansiedade (BLANCHARD *et al.*, 2011(a); FILE, 1990; FILE 1996).

Muita atenção têm-se dado a paradigmas para a caracterização comportamental e neuroquímica da ansiedade que sejam validados, não sejam confundidos por efeitos da exposição a estímulos dolorosos, sejam simples de conduzir e não requeiram treinamento complexos BELZUNG *et al.*, 2001; BLANCHARD *et al.*, 1998). Um desses paradigmas consiste em colocar os animais num ambiente não familiar, observando as alterações comportamentais emitidas. Tipicamente, estes animais apresentarão respostas similares àquelas elicitadas pelo odor do predador, com aumento da pressão arterial e frequência cardíaca e inibição dos comportamentos não-defensivos como aproximação ao alimento (SHEPHARD e BROADHURST, 1982; BODNOFF *et al.*, 1988; BODNOFF *et al.*, 1989). Esta resposta é antagonizada por agentes ansiolíticos (SHEPHARD e BROADHURST, 1982; BODNOFF *et al.*, 1988; BODNOFF *et al.*, 1989; MERALI *et al.*, 2003). Estes efeitos são específicos, de forma que fármacos que não possuem efeito ansiolítico falham em antagonizar a inibição comportamental nesse teste.

Em ratos, o estresse no período gestacional leva ao estado de ansiedade e depressão da prole nas fêmeas na vida adulta (ORDIAN *et al.*, 2011). Em humanos, filhos de pais com algum tipo de transtornos de ansiedade e depressão apresentam maiores chances de desenvolver ansiedade ao longo da vida (ASBAHR, 2004). Estudo retrospectivo com 84 pessoas demonstrou que a ansiedade na infância pode predispor a transtornos de pânico na vida adulta, com maiores chances de desenvolver depressão nesta fase da vida (MANFRO *et al.*, 2002). Estima-se que 10% das crianças e dos adolescentes irão desenvolver transtornos

relacionados à ansiedade. O entendimento sobre essa doença na infância pode auxiliar a prevenir danos ao longo da vida (ASBAHR, 2004).

Em ratos, o trauma precoce leva à alteração de comportamento (LEVINE, 1957; PADOIN *et al.*, 2001; IVY *et al.*, 2008). Diferentes estressores podem alterar o comportamento, levando a um estado de ansiedade e/ou depressão tanto em ratos (JAHNG, 2011; STEIMER 2011) quanto em humanos (HAMMEN *et al.*, 2009; WEBER *et al.*, 2008), assim como a preferência aguçada pelo alimento doce, atenuando, deste modo, a resposta ao estresse (PECORARO *et al.*, 2004; ULRICH-LAI *et al.*, 2011). O estresse crônico em ratos machos, iniciado na vida adulta, leva ao aumento do consumo de alimento doce, independente de fome, que pode ser revertido pelo ansiolítico diazepam (ELY *et al.*, 1997), sugerindo que a ansiedade está envolvida no aumento de consumo de alimento doce após a exposição ao estresse crônico na vida adulta. No entanto, o aumento de consumo de alimento doce na vida adulta de ratos manipulados no período neonatal não parece ser relacionado a ansiedade (SILVEIRA *et al.*, 2005).

A manipulação neonatal por curtos períodos leva a um menor estado de ansiedade (teste de campo aberto), independente do sexo, e, surpreendentemente, somente nas fêmeas que sofreram longos períodos de separação neonatal (MCINTOSH *et al.*, 1999.) No entanto, o estresse no período da vida adulta (por contenção) leva ao estado de ansiedade no teste de campo aberto, maior imobilidade no teste de nado forçado, demonstrando o estado depressivo em ratos e a baixa preferência por sacarose em 1 semana após o estresse (CHIBA *et al.*, 2012).

Em humanos, um estudo com 102 indivíduos com transtorno de ansiedade social e 30 controles demonstrou que o trauma na infância (abuso físico, negligência física) está associado com ansiedade, depressão e baixa autoestima (KUO *et al.*, 2011). Em ratos, a separação neonatal combinada com dieta deficiente de ômega-3 leva a maior estado de

ansiedade na vida adulta (MATHIEU *et al.*, 2011). A separação materna por longos períodos leva à diminuição da quantidade de entradas do animal nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Desse modo, a locomoção diminuída sugere comportamento ansioso da prole na vida adulta (DANIELS *et al.*, 2004) podendo estar associado ao estado de depressão, sintomas amenizados através da oferta de *comfort foods* (MANIAM e MORRIS, 2010).

## 2.5 ALIMENTOS CONFORTANTES OU “COMFORT FOODS”

O apetite e controle de peso em humanos são controlados por fatores como nutrição, influências hedônicas e a resposta ao estresse. O gênero é um fator que também pode influenciar na prevalência de obesidade (WANG, 2010). No Brasil, a Pesquisa de Orçamento Familiar (2008-2009) demonstrou que 16% das mulheres (com mais de 20 anos) estão obesas e nos homens a prevalência é de 12,4% (BRASIL, 2011). Estudos de neuroimagem demonstram que as mulheres apresentam maior atenção/vigília, memória de trabalho (córtex pré-frontal), com realce para alimentos (orbitofrontal córtex) durante uma estimulação alimentar (WANG *et al.*, 2009). Estudo conduzido em três países europeu (Alemanha n=696, Polônia n=489 e Bulgária n=654) demonstrou associação entre o consumo de *comfort food* (doces/*fast-food*) e o estresse em meninas no primeiro ano de faculdade. Já nos meninos, não houve associação (MIKOLAJCZYK *et al.*, 2009).

*Comfort food* são alimentos saborosos, que contêm normalmente açúcar e gorduras, são consumidos como forma de conforto aliviando os sintomas do estresse. (PECORARO *et al.*, 2004). Desse modo, a alimentação rica em gordura e açúcar reduz atividade da resposta ao estresse e reforça o hábito alimentar (DALLMAN, 2010).

Em modelo animal, o estresse iniciado na vida adulta e a exposição ao alimento palatável parecem resultar em diferentes padrões de comportamento. Além disso, o estresse

oxidativo no hipocampo e estriado difere de acordo com o sexo. Quando expostas ao estresse, as fêmeas demonstram resultados comportamentais de estado ansioso, porém, ao receber alimento palatável, com possibilidade de escolha (padrão ou palatável), reduzem o consumo de ração padrão e aumentam o consumo de *comfort foods* (KROLOW *et al.*, 2010). Numa situação parecida, machos submetidos ao estresse, também com possibilidade de escolha entre a ração padrão e *comfort foods*, aumentam o consumo de alimento palatável, apresentam menores níveis de corticosterona e ACTH (PECORARO *et al.*, 2004). Sugere-se que, através desse mecanismo, os ratos utilizam o alimento densamente calórico como “medicamento” para regular sua resposta ao estresse (eixo HPA) (TOMIYAMA *et al.*, 2011).

Em um estudo interessante, viu-se que a exposição crônica à dieta rica em gordura altera a resposta comportamental e fisiológica ao estresse, diminuindo a temperatura corporal e a inibição da resposta locomotora após o estresse quando comparada ao uso da ração padrão. Além disso, a resposta hipotérmica à injeção sistêmica de 8-OHDPAT (agonista dos receptores 5HT1a) após o estresse foi diminuída nos animais recebendo ração rica em gordura. Desse modo, sugerindo que o consumo de dieta rica em gordura bloqueia a hipossensibilidade do receptor 5-HT1a induzido pelo estresse. Isso demonstra que variações na composição de macronutrientes da dieta podem afetar o humor e a resposta ao estresse (BUWALDA *et al.*, 2001).

Objetivando explorar essas relações em humanos, um estudo avaliou mulheres que se auto-classificaram como altamente estressadas ou pouco estressadas. Conforme esperado, observou-se que mulheres altamente estressadas apresentaram maiores níveis de consumo alimentar (medido pelo *Dutch Eating Behavior Questionnaire*; DEBQ), maior circunferência abdominal e índice de massa corporal, assim como uma resposta ao estresse (medida pela curva de resposta de cortisol salivar ao estresse social) diminuída quando comparada com mulheres pouco estressadas. Isso demonstra que estas mulheres usam o alimento para alívio



do estresse (alimentação emocional), o que aumenta a obesidade abdominal e inibe a resposta ao estresse (TOMIYAMA *et al.*, 2011).

O consumo compulsivo por alimento palatável pode ser explicado pela ativação do sistema de recompensa ou pode ser explicado pela fraca resposta dos sinais de saciedade. Isso pode ocorrer de diferentes maneiras: 1) expressão aumentada dos sinais de fome 2) expressão reduzida de sinais de saciedade e seus receptores 3) a falta de um receptor sinalizando a resposta para o alimento palatável, em ambos os casos, levando a excessos. Uma região do cérebro que parece desempenhar função importante relacionada à ingestão de alimentos e à recompensa é o núcleo accumbens. Ele recebe informações a partir do tronco cerebral (em resposta a gosto e sensações gastrointestinais de alimentos ingeridos), através da conexão com o núcleo do trato solitário. Além disso, o núcleo accumbens tem ligação com hipotálamo lateral e é importante para homeostase energética. Estudos sobre os efeitos dos alimentos e o sistema de recompensa têm concentrado em três eixos de sinalização envolvendo: opióides endógenos, dopamina e a serotonina (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

Um estudo utilizou dieta rica em gordura e açúcar, objetivando demonstrar se o consumo desse alimento iria aumentar a síntese de opióides endógenos no hipotálamo no núcleo arqueado, PVN (por conterem peptídeos opióides) e dorso-medial do hipotálamo (centro que está envolvido na regulação da alimentação). A dieta utilizada resultou num aumento da expressão do gene opióide da dinorfina no núcleo arqueado, porém, não resultou em efeitos sobre a expressão gênica do NPY (WELCH *et al.*, 1996). Em animais, a manipulação neonatal nas primeiras semanas de vida leva a menor metabolismo de dopamina no núcleo accumbens (SILVEIRA *et al.*, 2010). A dopamina está envolvida nos circuitos de comportamento alimentar, relacionando-se com estruturas cerebrais específicas como o estriado e o córtex orbito-frontal. Em indivíduos obesos, a diminuição de receptores D2 no estriado, associado à sensibilidade aos alimentos palatáveis, aguçaria a busca por alimento,

predispondo à compulsão alimentar e à obesidade (WANG *et al.*, 2009), através de mecanismo similar aos de drogas de abuso (BLUMENTHAL e GOLD *et al.*, 2010). Acredita-se que o estresse no período precoce altera a transmissão do sistema dopaminérgico, levando a alterações estruturais no sistema nervoso e, desse modo, promovendo adaptações ou desenvolvimento de patologia (RODRIGUES *et al.*, 2010).

## 2.6 O PAPEL DA RELAÇÃO MÃE FILHOTE

A persistência de danos causados pela exposição aos eventos que acontecem em períodos críticos do desenvolvimento (como o período neonatal) denomina-se programação (WELBERG e SECKL, 2001). A programação está relacionada com as variações do cuidado materno durante o desenvolvimento (MEANEY, 2001). Diversos protocolos experimentais têm sido explorados para entender as questões envolvendo o cuidado materno, propondo intervenções que perturbam essa relação mãe-filhote e estudando o impacto destas intervenções na prole. Os desfechos irão depender tanto do tempo quanto da duração da intervenção, assim como a idade do filhote. Na literatura, períodos curtos de separação da mãe classicamente envolvem tempo de 3-15 minutos, os longos 3-12h e os prolongados, 24h (WALKER, 2010).

Seymour Levine<sup>2</sup> foi pioneiro nos trabalhos de pesquisa sobre manipulação neonatal (“*neonatal handling*”) e a menor resposta ao estresse da prole na vida adulta (LEVINE *et al.*, 1967). Mais tarde seus seguidores propõem que a manipulação neonatal dos filhotes altera o comportamento materno através da indução do ato de lambar os filhotes (LG) após a reunião

---

<sup>2</sup> Seymour “Gig” Levine (1925-2007) nasceu em Nova York e entrou para o exército em 1943, desembarcando na França no Dia D e sendo ferido na batalha de Bulge. Após seu retorno à América, tornou-se um renomado pesquisador que contribuiu para a ciência com trabalhos relevantes na área de Psicobiologia, Neuroendocrinologia e Neurociências.

da díade (LIU *et al.*, 1997 ). Isso afeta o desenvolvimento endócrino, assim como respostas comportamentais da prole na vida adulta (LIU *et al.*, 1997) (MEANEY e SZYF, 2005).

A manipulação neonatal altera o eixo HPA através do aumento da expressão gênica do receptor de glicocorticoide no hipocampo. Este efeito parece ser mediado pela serotonina (SMYTHE *et al.*, 1994). O receptor 5HT7 que se liga à serotonina é regulado pela ação dos glicocorticoides (YAU *et al.*, 1997) e AMP cíclico (MEANEY *et al.*, 2000).

Por fim, observando variações naturais do cuidado materno em roedores, alguns estudiosos identificaram que é possível classificá-las entre mães muito (*high*) e pouco (*low*) cuidadoras. Essas diferenças aparecem somente na primeira semana após o parto, uma vez que o cuidado é maior nos primeiros dias após o nascimento, e declina gradualmente. A definição do cuidado é realizada através da frequência de escores do LG (lambidas) e da posição arqueada para amamentação (CHAMPAGNE *et al.*, 2003). Após o nascimento dos filhotes, regulamente a mãe assume postura de amamentação com dorso arqueado (STERN, 1996) permitindo aos filhotes se mover, respirar e alimentar-se através da sucção do leite materno. Essa postura com dorso arqueado facilita a ejeção de leite porém a posição prona ou ainda a posição supina dificulta a ejeção do leite materno sendo portanto menos eficiente (VOLOSCHIN e TRAMEZANI, 1984).

Filhos de mães muito cuidadoras apresentam menos medo ao enfrentar situações adversas, explorando mais quando expostos a um ambiente novo quando, comparados a filhos de mães pouco cuidadoras (CALDJI *et al.*, 1998; WALKER, 2010). Na vida adulta, estes animais têm (1) aumento da densidade do receptor de benzodiazepínicos nos núcleos central, lateral e basolateral da amígdala, bem como no *locus coeruleus*, (2) aumento de adrenoceptor no *locus coeruleus* (3) diminuição da liberação de CRH no *locus coeruleus* (CALDJI *et al.*, 1998).

Filhotes de mães com baixo padrão de LG, se cuidados por mães com alto cuidado materno, beneficiam-se do efeito positivo do LG (CHAMPAGNE *et al.*, 2003; MEANEY e SZYF, 2005). Filhotes de mães com alto LG respondem ao estresse agudo com menores níveis de ACTH quando comparados aos filhotes de mães de baixo LG (LIU *et al.*, 1997; WEAVER *et al.*, 2004).

Com a estimulação sensorial/tátil que as mães impõem ao lambar mais os filhotes após a manipulação neonatal, ocorre elevação dos níveis do NGFI-A (Fator de Crescimento do Nervo Induzível pelo Fator A) (ENCIO e DETERA-WALDLEIGH, 1991; MEANEY *et al.*, 2000), e facilitação do acesso de desmetilases ao DNA, promovendo a desmetilação do sítio promotor do GR (CARVIN *et al.*, 2003). Desse modo, com o sítio promotor desmetilado e aumento da concentração do fator de transcrição (NGFI-A), ocorre maior atividade do sítio promotor de GR induzida por NGFI-A no hipocampo com uma maior produção de receptores GR de glicocorticóides nessa estrutura (WEAVER, 2004).

Em ratos, a simples restrição de material para construir o ninho deturpa a relação entre mãe-filhote (em ratos) (IVY *et al.*, 2008) resultando em prejuízos no hipocampo, aumento de corticosterona basal, aumento do peso adrenal, diminuição do peso corporal, diminuição do CRH e dos receptores de glicocorticóides (BRUNSON *et al.*, 2005; AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001).

### 3 JUSTIFICATIVA

O trauma precoce (como por exemplo a separação materna, o abuso sexual e a negligência) pode contribuir para transtornos na vida adulta, uma vez que eventos estressores no período neonatal levam a desfechos desfavoráveis na vida adulta tais como: distúrbios psicológicos, comportamentais e metabólicos. Há uma estreita relação entre estresse na vida adulta, ansiedade e o consumo de *comfort food*, uma vez que o consumo deste tipo de alimento parece auxiliar no alívio dos sintomas do estresse, envolvendo mecanismos neuroendócrinos tanto em roedores quanto humanos. No entanto, pouco se sabe sobre trauma na vida precoce, a indução de ansiedade e o conseqüente consumo de alimento palatável na vida adulta. A utilização de modelo animal viabiliza, de forma rápida, que as hipóteses sejam respondidas, assim como torna possível que algumas variáveis confundidoras sejam controladas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da exposição ao ambiente perinatal hostil (redução do material disponível para a construção do ninho) no desenvolvimento de ansiedade e no consumo de alimento palatável em fêmeas na vida adulta, assim como os possíveis sistemas envolvidos: hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e hipotálamo-pituitária-tireóide (HPT).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o crescimento dos animais ao longo da vida comparando os grupos controle e intervenção.
- Caracterizar o consumo de ração padrão e alimento palatável na vida adulta comparando os grupos controle e intervenção.
- Avaliar o desenvolvimento de comportamento do tipo ansioso na vida adulta através do teste de supressão alimentar pela novidade (NSFT) comparando os grupos controle e intervenção.
- Verificar potenciais mecanismos relacionados ao desenvolvimento de ansiedade, através da investigação dos eixos: hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), com avaliação dos níveis corticosterona e ACTH, e hipotálamo-pituitária-tireóide (HPT), através avaliação níveis de triiodotironina (T3) no plasma de fêmeas na vida adulta, comparando os grupos controle e intervenção.

## 5 HIPÓTESE

O trauma precoce leva ao desenvolvimento do estado de ansiedade em fêmeas na vida adulta, alterando tanto a atividade do eixo HPA como o comportamento alimentar. Disso resulta o consumo de alimentos palatáveis (“*comfort food*”) como forma de inibir os sintomas de ansiedade. Como hipótese secundária, propomos que o eixo HPT seja afetado por este tipo de trauma.

## 6 METODOLOGIA

### 6.1 ESTUDO EXPERIMENTAL

#### 6.1.1 Animais

Ratas Wistar nulíparas, provenientes da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), foram acasaladas na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), permaneceram em caixas-moradia individuais, especialmente desenvolvidas para este modelo animal, medindo 40cm x 40cm x 30cm, com assoalho de malha metálica (1cm x 1cm) que permitisse apenas a passagem das fezes e urina para um coletor localizado na parte inferior da caixa. Durante toda a gestação, as fêmeas foram mantidas nessas caixas-moradia com o assoalho recoberto com maravalha e em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 10/14horas (luzes acendiam às 9h e apagavam às 19h), temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , água e comida *ad libitum*. A limpeza das caixas-moradia foi realizada uma vez por semana. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o Dia 0. O comportamento materno foi monitorado do dia 1 ao dia 9 de vida. No dia 2, as fêmeas e suas ninhadas foram randomizadas para dois grupos. No dia 10, as fêmeas e seus filhotes foram removidos para uma caixa-moradia padrão, medindo 46cm x 31cm x 16cm, com o assoalho recoberto com maravalha e mantidos no mesmo ambiente controlado conforme citado acima.

No dia 21 de vida, os filhotes foram desmamados e separados por sexo, em dois ou três por caixa-moradia, e mantidos em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acendiam às 7h e apagavam às 19h), temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , água e comida *ad libitum*. Os machos foram destinados a outro projeto e neste trabalho foram utilizadas somente as fêmeas.



Foram utilizadas no total 17 ninhadas, sendo os filhotes distribuídos para diferentes experimentos, conforme a figura 1. O tamanho da ninhada variou de 3 a 15, mas a média do número de filhotes não foi diferente entre os grupos (média±DP – controle: 8,9±3,68 e intervenção: 10,3±3,39,  $p=0,409$ ), sendo esta variável utilizada como co-variável em determinadas análises (ver “Análises Estatísticas”). As 17 ninhadas utilizadas para a observação do cuidado materno foram divididas em duas coortes e, ao comparar os componentes do cuidado materno entre as duas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

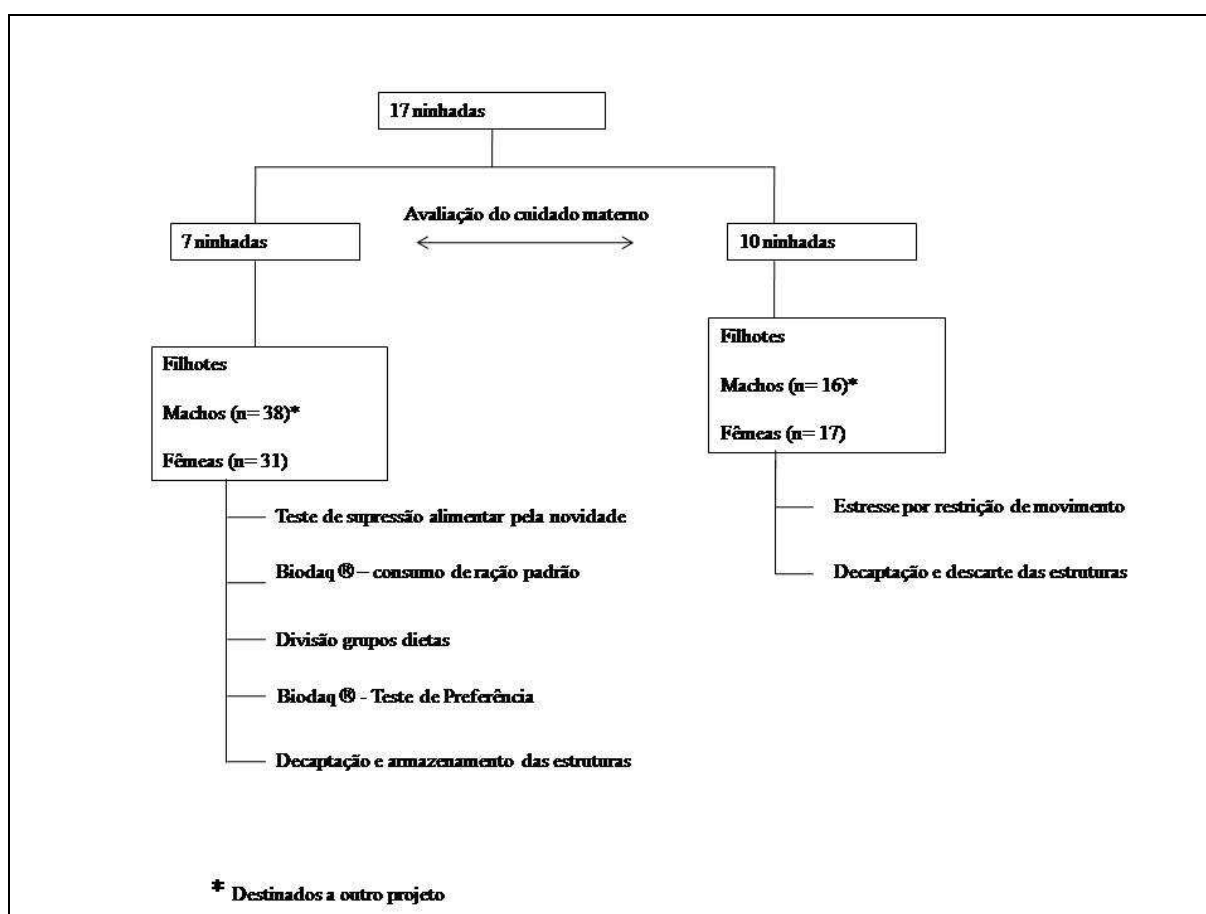
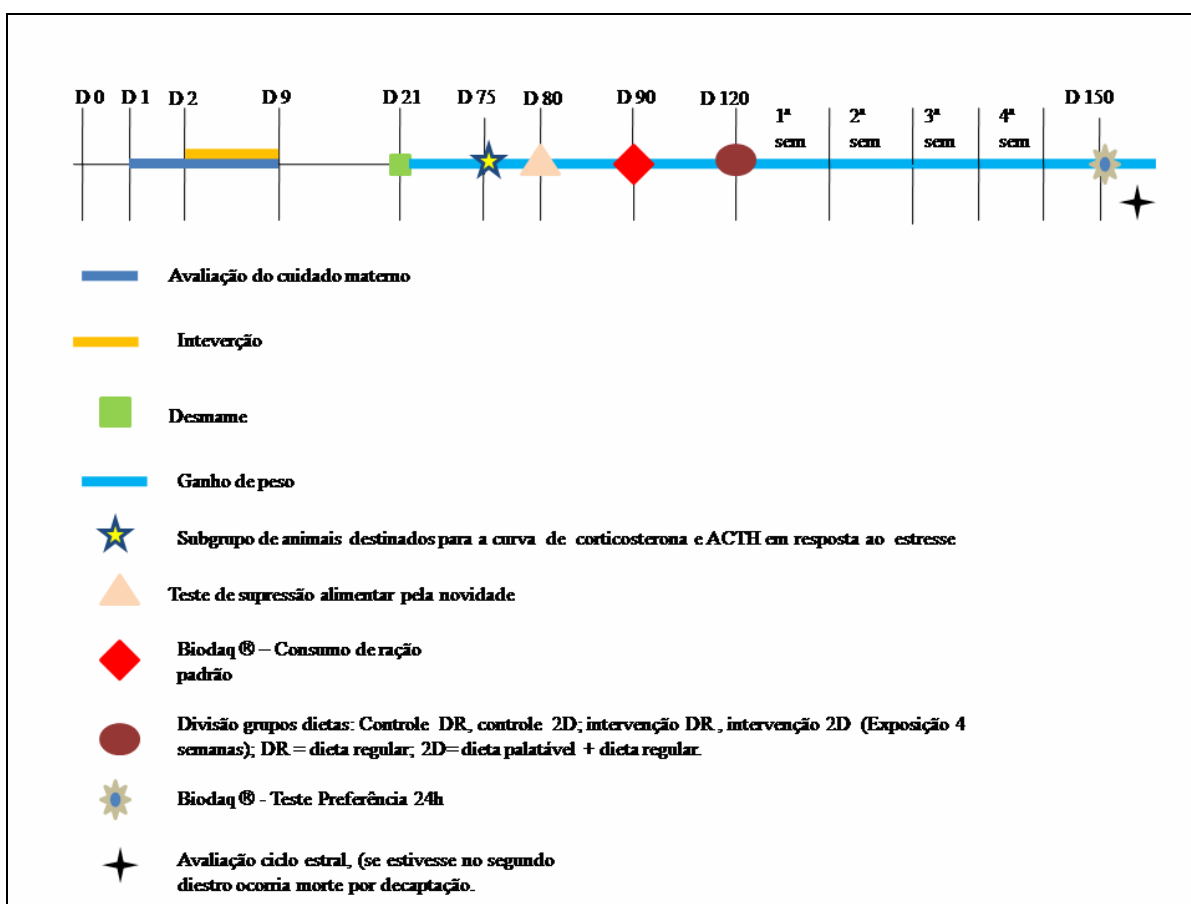


Figura 1 - Esquema mostrando a distribuição das ninhadas nos diferentes experimentos realizados.

Os testes na vida adulta iniciaram no 80<sup>o</sup> dia. Duas levas foram utilizadas: uma para o teste estresse por restrição de movimento que fizeram apenas esse procedimento, e outra para o teste de supressão alimentar para novidade (NSFT), consumo de ração padrão e teste de preferência alimentar por alimento palatável. Os testes foram realizados em salas comportamentais aclimatadas na UEA-HCPA. A figura 2 ilustra a linha de tempo do procedimento experimental e testes comportamentais.



D: dia de vida; sem: semana

Figura 2 - Linha de tempo do procedimento experimental e teste comportamental.

### 6.1.2 Grupos Neonatal

*Grupo intervenção (ambiente neonatal hostil):* seguindo os procedimentos descritos por Ivy *et al.* (2008), o grupo intervenção teve restrição do material para a confecção do ninho

durante oito dias (do dia 2 ao dia 9 pós-natal). A restrição consistiu em remover a maravalha da caixa-moradia, no dia 2, sem tocar nos animais, e oferecer um total de apenas 2000 cm<sup>3</sup> de papel toalha para a confecção de um ninho rudimentar neste período. A urina e as fezes dos animais se depositavam no coletor localizado na parte inferior da caixa, e o assoalho de malha metálica era, geralmente, conservado limpo pela genitora. Todas as ninhadas foram mantidas sem troca do papel toalha do dia 2 ao dia 9.

*Grupo controle:* no grupo controle as genitoras tiveram a sua disposição quantidade suficiente de maravalha para a construção do ninho (aproximadamente 7200 cm<sup>3</sup>). Todas as ninhadas foram mantidas com este volume de maravalha, sem troca de caixa-moradia do dia 2 ao dia 9.



**Figura 3 - Figura do grupo controle neonatal.**



**Figura 4 - Figura do grupo intervenção neonatal.**

### 6.1.3 Observações do cuidado materno

Os procedimentos de avaliação do cuidado materno ocorreram na unidade de experimentação animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por integrantes do Núcleo de Estudos em Saúde da Criança e do Adolescente.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre conta em sua estrutura com o Centro de Pesquisa Experimental (CPE). O CPE promove a integração entre os diferentes grupos de pesquisadores e a racionalização de recursos de pesquisa, disponibilizando infraestrutura completa para as atividades em seis laboratórios multiusuários e área física para o desenvolvimento de projetos específicos em vinte laboratórios temáticos. Além disso, compreende a Unidade de Experimentação Animal, que possui vários alojamentos para diferentes espécies, salas de comportamentos, procedimentos, cirurgias de pequeno e grande porte e necropsia, equipadas com diversos aparatos e equipamentos para uso compartilhado.

O Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) e, especificamente o Laboratório de Pediatria Translacional conta com a participação de alunos de diferentes níveis (iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado), que trabalham em conjunto nos diferentes projetos. Dessa forma, a equipe se mantém em freqüente contato com os diferentes procedimentos como observação do cuidado maternal, análise comportamental e dissecação de estruturas. Isso permite a qualificação dos componentes do grupo, assim como a possibilidade de capacitação dos novos participantes. Mesmo assim, procedimentos que contam com alguma subjetividade como a dissecação da gordura abdominal geralmente são feitas pela mesma pessoa para um determinado projeto. No caso do projeto atual, procedeu-se igualmente desse modo.

Seguindo os procedimentos descritos por Champagne *et al.* (2003), o comportamento materno de cada genitora foi observado diariamente em cinco períodos, de 72 minutos cada, do dia 1 ao dia 9 pós-natal, por vários observadores do nosso grupo de pesquisa, NESCA, treinados através de observações supervisionadas repetidas. Além disso, foi realizada a supervisão da análise diária das planilhas, onde os dados eram registrados, por observador experiente do nosso grupo de pesquisa. As observações ocorriam sempre nos mesmos horários, sendo três períodos durante a fase clara (10h, 13h, 17h) e dois períodos durante a fase escura (07h e 20h). Em cada período de observação, o comportamento da genitora foi registrado a cada três minutos (25 observações/dia x 5 períodos/dia = 125 observações/genitora/dia), sendo que o observador registrava o comportamento que estava acontecendo no instante em que ele olhava para os animais (ou seja, como se o observador tirasse uma fotografia do que estava acontecendo exatamente no instante da observação). Os seguintes comportamentos maternos foram registrados:

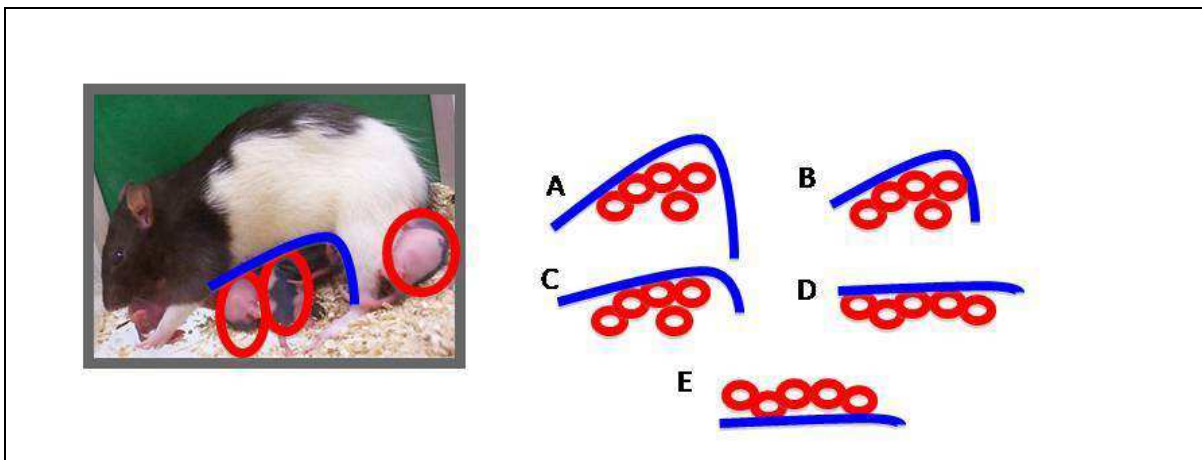
- a) Genitora em contato com os filhotes – no mínimo 3 filhotes.
- b) Genitora fora do ninho.
- c) Genitora amamentando os filhotes, conforme a posição do dorso arqueado: (1), (2), (3) ou (4); sendo a posição (1) a menos arqueada e a posição (4) a mais arqueada.
- d) Genitora amamentando os filhotes de forma passiva, ou seja, quando ela está deitada de costas ou de lado ao amamentar.
- e) Genitora lambendo (*licking and grooming* ou LG) qualquer filhote.

As variáveis de cuidado materno utilizadas neste trabalho foram a avaliação das posturas de amamentação e a frequência de lambidas.

Os escores de cada comportamento foram calculados, dividindo a frequência do comportamento pelo número total de observações utilizando uma planilha de Microsoft Excel®.

As posturas de amamentação são classificadas conforme a posição do dorso arqueado. Na posição 4, a genitora está imóvel e numa postura de alto arqueamento dorsal, apoiada por patas dianteiras e traseiras rígidas e a cabeça baixa, com o tronco e membros simétricos bilateralmente. A maioria ou todos os filhotes estão sendo amamentados. As posições 3 e 2 são posturas progressivamente menos intensas da posição 4 (ver figura 5); nesses casos, a genitora está sobre os filhotes, relativamente imóvel, membros colocados de forma simétrica bilateralmente, com a cabeça na posição de repouso (não baixa) numa postura de arqueamento dorsal baixo apoiada por patas dianteiras e traseiras rígidas (posição 3) ou numa postura de arqueamento dorsal baixo apoiada por patas dianteiras ou traseiras rígidas (posição 2). Na posição 1, a genitora se coloca sobre os filhotes sem arqueamento dorsal com pouco ou nenhum apoio de membros. Na posição passiva, a genitora está amamentando um ou mais filhotes deitada com o ventre para cima ou de lado (LONSTEIN et al., 1998; PRYCE et al., 2001).

A frequência de lambidas é avaliada por anotar o número de vezes que a genitora encontra-se lambendo um ou mais filhotes durante a observação do cuidado materno. As lambidas podem acontecer de forma concomitante a outros comportamentos como a amamentação.



**Figura 5- Posturas de amamentação.** A linha representa o ventre da genitora visto lateralmente, e os círculos representam os filhotes A) postura 4; B) postura 3; C) postura 2; D) postura 1 e E) postura passiva.

#### 6.1.4 Avaliação do ganho de peso corporal

O peso corporal foi avaliado uma vez por semana, utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Após 120 dias de vida, momento em que houve divisão dos grupos neonatal (controle e intervenção) em grupos dieta (dieta regular ou opção dieta regular + dieta palatável), padronizou-se no mesmo dia pesar os animais e as rações semanalmente, com exceção da primeira semana, onde os animais foram pesados diariamente nas primeiras 72h após início das novas rações.

#### 6.1.5 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento

Após o 75º dia de vida, um subgrupo de animais intactos (ou seja, que não tinham realizado nenhum teste comportamental) representativo de cada grupo neonatal foi submetido a esse experimento. Os animais foram envoltos em uma toalha e tiveram 3 mm da ponta de sua cauda cortada com um bisturi. Um pequeno volume de sangue (0,15 ml) foi coletado da cauda do animal, realizando massagens suaves da base até a ponta. Depois disso, os animais

foram rapidamente imobilizados em um tubo plástico de diâmetro variável, com uma das extremidades aberta para permitir a entrada de ar, fixado com fita adesiva, de forma a restringir a mobilidade dos grandes grupos musculares. Os animais ficaram imobilizados por 20 minutos e amostras adicionais de sangue foram obtidas ao final da imobilização e aos 20, 40 e 70 minutos subsequentes (TANNENBAUM *et al.*, 1997). As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos heparinizados, entre as 9h e 11h, centrifugadas a 4000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C e o plasma foi armazenado a -80°C até serem analisados os níveis de corticosterona e ACTH conforme descrito abaixo.

#### **6.1.6 Teste de supressão alimentar pela novidade (NSFT)**

Para a realização do teste, os animais foram habituados ao novo alimento (Froot Loops® da Kellogs - rosquinhas de amido de milho, trigo e sacarose), recebendo três unidades por animal por 4 dias dentro de sua caixa moradia. As habituações ocorreram no horário de 12h às 13h.

Após 16 horas de jejum, as ratas fêmeas foram colocadas, individualmente, em uma arena (54x43cm) contendo 1 pellet de Froot Loops (Kellogs ®) no centro. Mediu-se o tempo que cada animal levou para iniciar o consumo do pellet (tempo de latência) e foi estipulado um tempo máximo de 10 minutos de espera para início desse comportamento, e imediatamente cada fêmea foi recolocada em sua caixa moradia, com quantidade previamente conhecida de ração padrão, por um período de 5 minutos. Após, mediu-se o remanescente de ração utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Após cada teste, a arena foi higienizada com álcool 70%. Classicamente, a inibição do consumo alimentar pela novidade é interpretada como uma medida de ansiedade (GROSS *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2010).





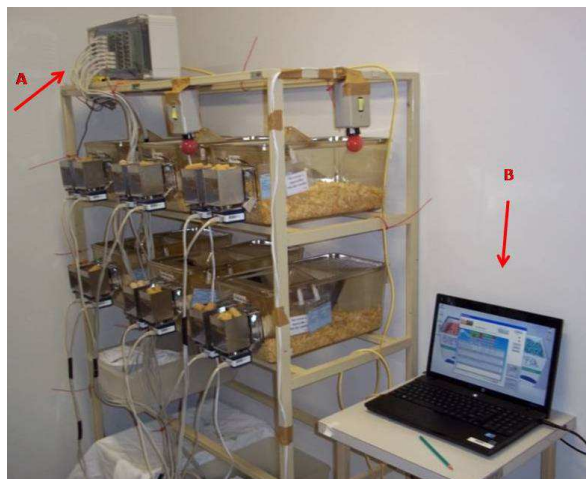
**Figura 6 - Vista frontal da arena utilizada para o teste de Supressão Alimentar pela Novidade (NSFT).**

### **6.1.7 Consumo alimentar de ração padrão- BioDaq®**

O BioDaq® (*Research Diets*) é um equipamento que permite a avaliação detalhada do consumo alimentar em episódios. É possível avaliar a quantidade consumida, duração e tamanho da refeição, intervalo entre as refeições, momento do dia, dentre outras medidas. É acoplado um “comedouro”, onde é colocada a ração, na parte externa da caixa onde o animal fica alojado. O comedouro é encaixado sobre uma balança que mede o peso do comedouro a cada segundo. Desse modo, o fluxo de dados é enviado e processado por uma central, e posteriormente enviado ao computador para armazenamento e posterior análise. A central monitora continuamente o peso dos comedouros e usa esta informação para detalhar os dados da refeição consumida pelo animal. Para análise, a central considera várias mordidas (“*bouts*”) que compõem uma refeição (“*meal*”) num intervalo de 15 minutos (900 segundos). Cada refeição realizada por cada animal era captada pelo sistema (acurácia de 0,01g), sendo que as refeições foram gravadas individualmente de forma ininterrupta durante os dias de permanência no aparelho. Os dias 1-3 foram considerados a habituação, onde esperou-se que

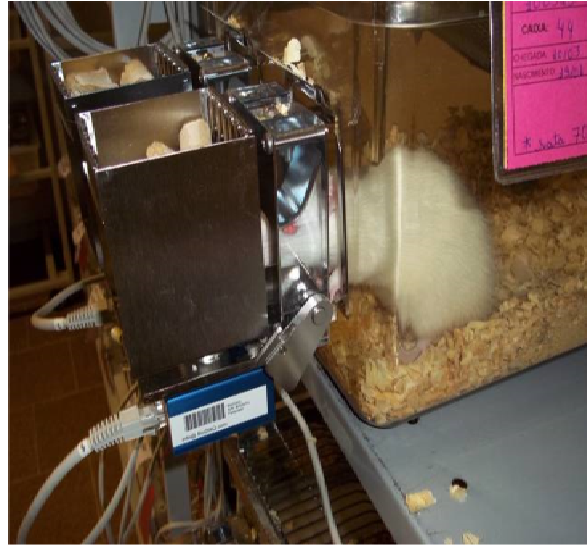
o animal se ambientasse com a nova caixa e aprendesse a obter o alimento do comedouro, e os dias 4-7 foram usados para a análise propriamente dita do consumo alimentar.

Através do BioDaq®, foi avaliado o consumo de ração padrão habitual (22% de proteína, lipídeos 4,5%, cardoidratos 54%, 2,95Kcal/g; marca NUVILAB®). Em torno dos 90 dias de vida, as fêmeas foram colocadas nesse aparelho com livre acesso à ração padrão e água *ad libitum*. A ração foi disponibilizada para os animais permitindo o consumo continuamente. Pedacos pequenos da ração (farelos) que caíam nas caixas eram removidos diariamente e ração nova era reposta nos comedouros.

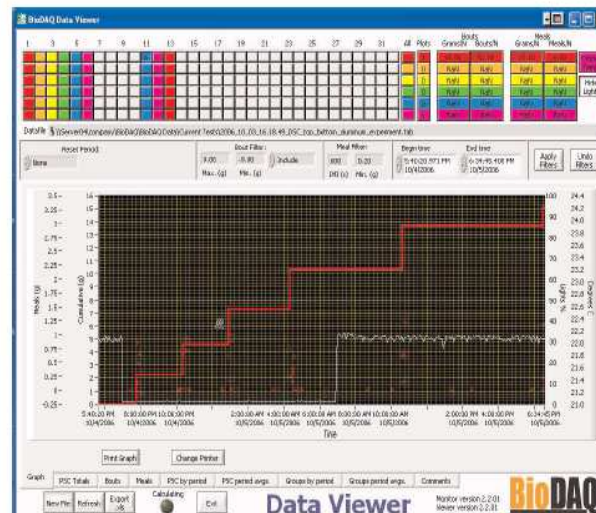


**Figura 7 - Vista do BioDaq®.**

Cada caixa em que o animal se encontra está conectada a uma central (A) que envia as informações diretamente ao computador (B).



**Figura 8 - Vista lateral do BioDaq®.**



**Figura 9 - Dados do consumo dos animais processados pela central do BioDaq® e emitidos ao computador.**

### 6.1.8 Subdivisão dos grupos neonatais em diferentes dietas

Quinze dias após a saída dos animais do BioDaq®, os grupos neonatais (controle e intervenção) foram randomizados por peso corporal. As ratas foram divididas em três grupos: maior, médio e menor peso corporal e randomizadas para os grupos a seguir visando evitar que a maioria das fêmeas com maior peso corporal fossem alocadas para o grupo duas dietas

com a opção da dieta palatável. Os grupos neonatais (controle e intervenção) foram subdivididos em:

- a) Controle com dieta regular;
- b) Controle com dieta regular + dieta palatável (rica em gordura e açúcar)
- c) Intervenção com dieta regular;
- d) Intervenção com dieta regular + dieta palatável (rica em gordura e açúcar).

Todos os grupos receberam rações novas às quais não estavam acostumados durante 4 semanas, portanto mesmo a ração regular era diferente da ração padrão consumida pelos animais até então. Isso foi feito para que todos os animais enfrentassem os efeitos da neofobia alimentar e portanto esse viés pudesse ser diluído entre os diferentes grupos experimentais. A composição da ração regular era: 22% proteína, 4% de gordura, 60% carboidrato, 3,64Kcal/g; a dieta palatável consistia em 14% de proteína, 34% de gordura, 30,2% de carboidrato (sendo 20% em sacarose); 4,82Kcal/g. Ambas as dietas foram produzidas pelo laboratório Prag Soluções Biociências® (São Paulo, Brasil), visando minimizar possíveis vieses. O peso corporal e o consumo foram avaliados 24h, 48h e 72h após o início das novas dietas. Após este período, esses parâmetros foram avaliados semanalmente.

#### **6.1.9 Teste de Preferência Alimentar - BioDaq®**

Após 4 semanas recebendo as respectivas rações descritas no item anterior, todos os grupos foram expostos ao teste de preferência alimentar no BioDaq®, recebendo ração regular e ração palatável simultaneamente e livremente por 24h. Após a finalização do teste, os animais foram retirados do equipamento e colocados individualmente em caixas-moradias padrão. Foi calculada a preferência alimentar por dieta palatável ou percentagem de consumo

de alimento palatável em relação ao total consumido através do seguinte cálculo: [consumo de ração palatável/(consumo de ração palatável + consumo de ração regular)]\*100.

#### **6.1.10 Avaliação do ciclo estral das fêmeas**

Após 24h de término do teste de preferência alimentar, as fêmeas tiveram o ciclo estral acompanhado, determinado através de esfregaço vaginal todas as manhãs das 9h-10h. Todas as ratas foram sacrificadas no mínimo 48h após o teste de preferência alimentar, no segundo dia do diestro (diestro II), quando a variação hormonal é menor (TER HORST *et al.*, 2012; SEVERINO *et al.*, 2004).

#### **6.1.11 Coleta e armazenamento de tecidos**

No dia da confirmação do diestro II, as fêmeas foram decapitadas após jejum de aproximadamente 16 horas, em torno dos 150 dias de vida. O sangue do tronco foi coletado em tubos com EDTA e as amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e o plasma separado e armazenado a -80°C até o dia das análises bioquímicas dos hormônios da tireóide.

As duas maiores porções de gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas por 2 pesquisadores treinados e pesadas, usando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Os resultados da quantidade de gordura abdominal foram calculados como percentual do peso corporal.

#### **6.1.12 Análises bioquímicas**

A corticosterona foi avaliada por ELISA, usando os kits comerciais Corticosterone EIA Kit Enzo Life Sciences Int'l Inc., Plymouth Meeting, PA, USA, seguindo as instruções dos fabricantes.

As determinações de corticosterona foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia do Estresse do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

A triiodotironina (T3) e o ACTH foram quantificados no plasma no Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por meio de imunoensaio por quimioluminescência direta.

## 6.2 ASPECTOS ÉTICOS

### 6.2.1 Animais

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente segundo a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG/HCPA) (número do protocolo 11-0182).

## 6.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados coletados foram digitados e analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). Os dados foram analisados por Teste t de *Student*, usando o grupo neonatal como fator

(NSFT e padrão do consumo alimentar no BioDAQ®), ou ANOVA de medidas repetidas (peso corporal, habituação ao BioDAQ®, ganho de peso, consumo de dieta padrão e preferência por dieta palatável durante as 4 semanas de exposição), usando grupo neonatal como fator e ajustado pelo tamanho da ninhada (peso corporal, ganho de peso e preferência por alimento palatável durante a exposição crônica) e pelo peso prévio à exposição crônica às dietas (preferência por dieta palatável durante a exposição crônica) quando necessário (isto é, quando essas co-variáveis afetavam significativamente o desfecho nos resultados de análises preliminares). ANOVA de uma via foi usada para o cuidado materno utilizando como fator o grupo neonatal ajustado para o tamanho da ninhada. ANOVA de duas vias foi usada para avaliar o teste de preferência por alimento palatável no BioDAQ® e a gordura abdominal, usando grupo neonatal e grupo dieta como fatores, seguido por *pos hoc* de Bonferroni. A análise por Equações de Estimação Generalizadas (GEE) foi usada para a resposta hormonal ao estresse agudo (corticosterona e ACTH). A correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar o LG com os níveis de T3 plasmático. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 GRUPOS CONTROLE E INTERVENÇÃO**

#### **7.1.1 Cuidado materno**

A média do LG foi semelhante entre o grupo controle e o grupo intervenção, no entanto, o desvio padrão do LG foi 2,7 vezes menor no grupo intervenção. O percentual de tempo em que as genitoras do grupo intervenção amamentaram seus filhotes foi maior [F(1,

14)=6,00,  $p=0,028$ ], porém encontrou-se um maior tempo de amamentação nas posições 1 e 2 [ $F(1, 14)=16,67$ ,  $p=0,001$ ], consideradas posturas menos eficazes, nesse mesmo grupo. (Tabela 1).

**Tabela 1 - Comparação entre as médias das variáveis relacionadas com o cuidado materno.**

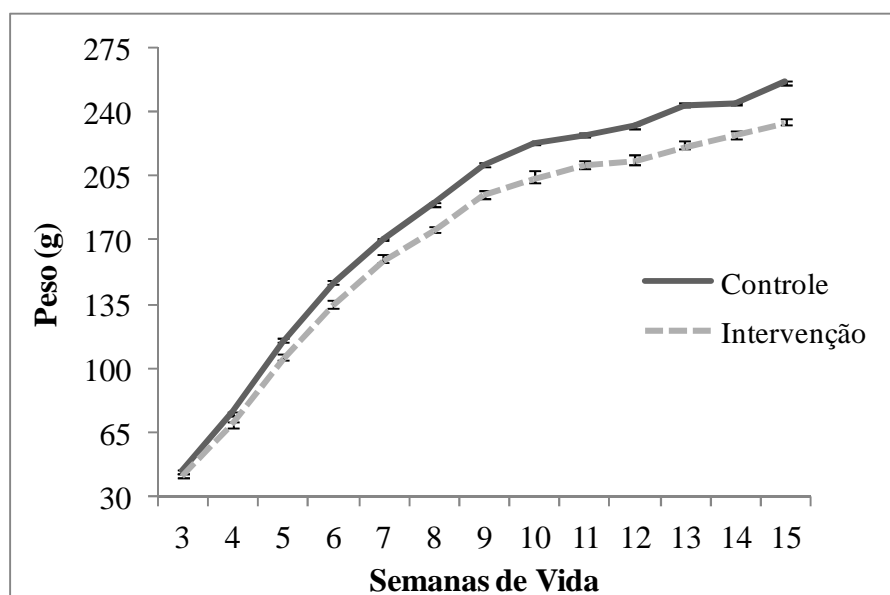
<b>Variáveis</b>	<b>Controle (n=8)</b>	<b>Intervenção (n=9)</b>	<b>Valor <i>p</i></b>
LG	8,06±2,02	8,73±0,73	0,630
Amamentação passiva	5,05±2,28	3,80±2,37	0,299
Posição de amamentação 1 e 2	32,86±6,97	40,76±5,85	0,001*
Posição de amamentação 3 e 4	11,73±4,70	11,53±4,96	0,635

ANOVA de uma via; usando como co-variável o tamanho da ninhada; valores expressos em média ± DP; \* $p<0,05$

### 7.1.2 Peso ao longo das primeiras 13 semanas após o desmame

A ANOVA de medidas repetidas, considerando 13 semanas, antes do início das dietas, de acompanhamento de ganho de peso, utilizando o tamanho da ninhada como co-variável, demonstrou que houve efeito do tempo [ $F(12, 324)=167,591$ ,  $p<0,0001$ ], mostrando que os animais ganharam peso ao longo das semanas, assim como interação entre o tempo e o tamanho da ninhada [ $F(12, 324)=2,437$ ,  $p=0,005$ ], no qual filhotes nascidos de ninhadas maiores ganharam menos peso ao longo do tempo. Também foi vista interação entre tempo e grupo neonatal, onde grupo intervenção ganhou menos peso do grupo controle ao longo do tempo [ $F(12, 324)=3,321$ ,  $p<0,0001$ ]. Houve também efeito do grupo neonatal no ganho de peso [ $F(1, 27)=15,064$ ,  $p=0,001$ ]. Não se observou interação entre outras variáveis (Figura 9).

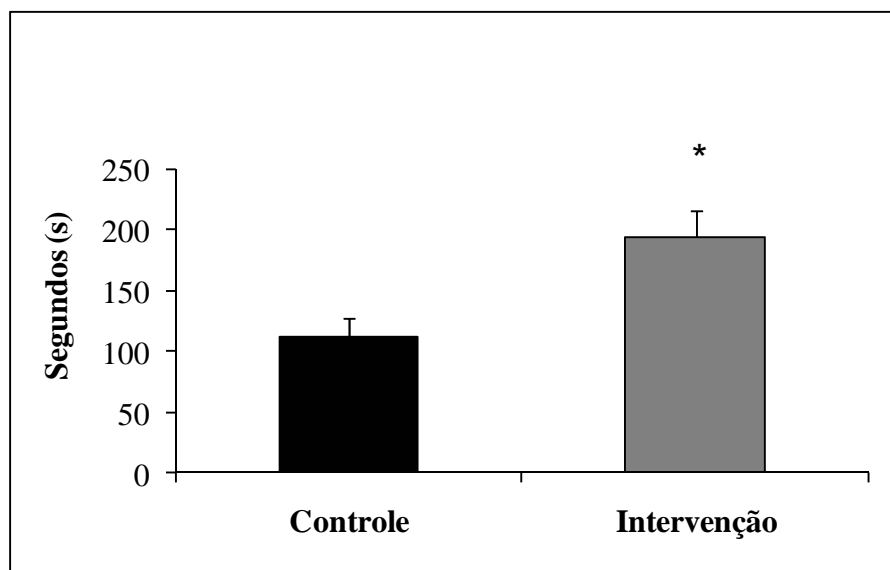




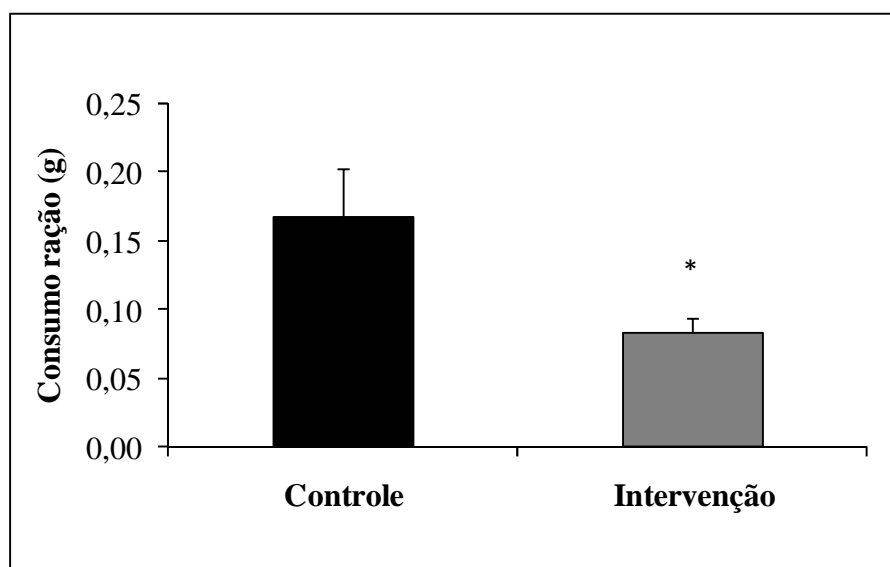
**Figura 10 -** Peso corporal, ao longo de 13 semanas de vida, após o desmame, nas fêmeas controle (n=10), fêmeas intervenção (n=20). Dados expressos em média  $\pm$  EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou interação entre tempo e grupo neonatal ( $p < 0,0001$ ) e efeito do tempo ( $p < 0,0001$ ).

### 7.1.3 Teste de supressão alimentar pela novidade (NSFT)

O Teste t de *Student* demonstrou que as fêmeas do grupo intervenção apresentaram maior tempo de latência para iniciar o consumo de froot loops® no ambiente novo quando comparadas às controles (Figura 10). Além disso, o grupo intervenção apresentou menor consumo de ração padrão comparado ao controle quando recolocado na caixa-moradia após a imediatamente após a exposição à novidade (figura 11).



**Figura 11 - Latência para o consumo de Froot Loops no teste de supressão alimentar pela novidade. Fêmeas controle (n=10) intervenção (n=20). Dados expressos em média  $\pm$  EP. Teste t de *Student* demonstrou diferença no tempo médio de latência entre os grupos (p=0,005).**



**Figura 12 - Consumo de ração padrão no teste de supressão alimentar pela novidade. Fêmeas controle (n=11) intervenção (n=17). Dados expressos em média  $\pm$  EP. Teste t de *Student* demonstrou diferença no consumo de ração entre os grupos (p=0,045).**

#### 7.1.4 Perfil de consumo alimentar de ração padrão - BioDaq®

A tabela 2 demonstra os dados da habituação dos animais ao BioDaq®. Vê-se que, com o passar dos dias, os grupos se habituaram ao equipamento, aumentando o consumo médio

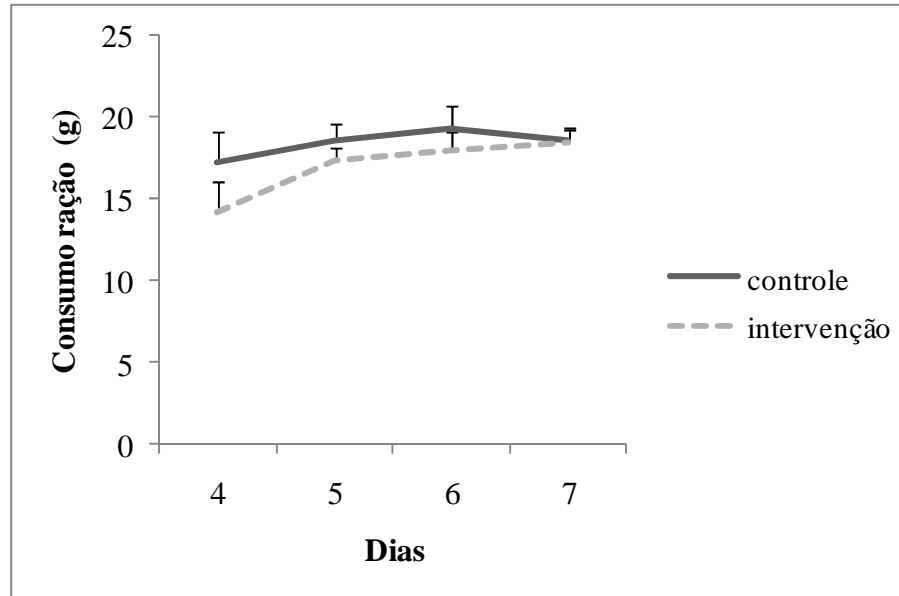
de ração padrão ao longo dos dias [ $F(2, 32)=4,273$ ;  $p=0,023$ ]. Não houve interação entre tempo e grupo neonatal [ $F(2, 32)=0,774$ ;  $p=0,470$ ] nem efeito isolado do grupo [ $F(1, 16)=3,927$ ;  $p=0,065$ ].

**Tabela 2 - Comparação entre as médias de consumo de ração padrão durante os três dias de habituação ao BioDaq®.**

<b>Variáveis</b>	<b>Controle (n=5)</b>	<b>Intervenção (n=13)</b>
Primeiro dia	8,06±1,78	7,17±1,42
Segundo dia	11,56±1,68	7,33±1,65
Terceiro dia	15,88±1,74	10,36±1,74

ANOVA de medidas repetidas não mostrou interação entre tempo e grupo neonatal  $p=0,470$ . Valores expressos em média  $\pm$  EP.

A ANOVA de medidas repetidas do consumo alimentar nos dias de mensuração após a habituação não demonstra mais efeito do tempo [ $F(3,48)=1,217$ ;  $p=0,314$ ], sugerindo que os animais já estavam habituados ao equipamento e mantiveram o padrão habitual de consumo ao longo dos dias. Também não houve interação do tempo e grupo neonatal [ $F(3,48)=0,197$ ;  $p=0,0898$ ], nem efeito isolado do grupo [ $F(1,16)=0,599$ ;  $p=0,450$ ] (figura 12).



**Figura 13 –Consumo de ração padrão (últimos 4 dias) no BioDAQ®. ANOVA de medidas repetidas; grupos controle (n=5) e intervenção (n=13) no dia 4; nos dias seguintes controle (n=9) intervenção (n=20) valores expressos em média  $\pm$  EP; Não houve interação entre tempo e grupo neonatal ( $p=0,0898$ ).**

#### **7.1.5 Caracterização do consumo de ração padrão basal no BioDaq®**

Teste t de *Student*, considerando o consumo de ração padrão nos últimos três dias no BioDaq®, demonstrou que houve diferença entre os grupos no ciclo escuro ( $p=0,047$ ). Não houve diferença no consumo em 24h, tamanho da refeição, número de refeições, tamanho da refeição no ciclo escuro, número de refeições no ciclo escuro, consumo no ciclo claro e número de refeições no ciclo claro (tabela 3).

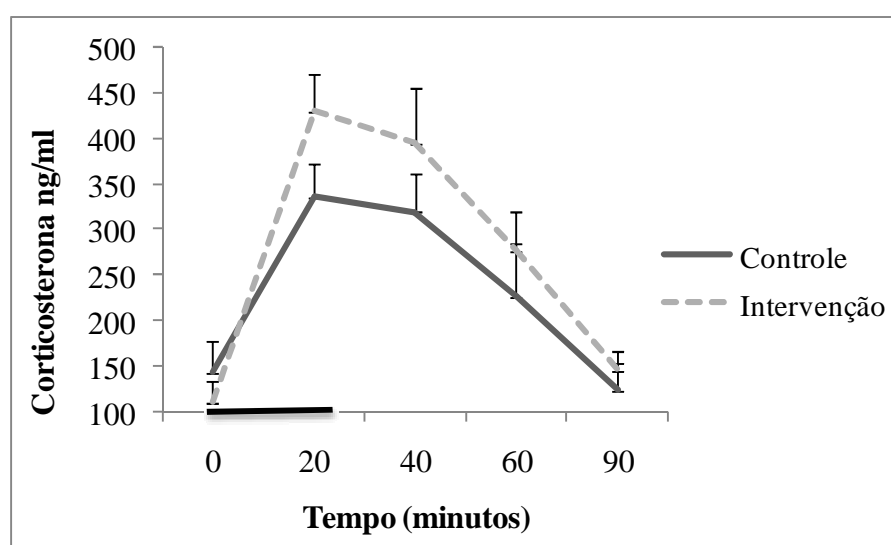
**Tabela 3 - Caracterização do consumo de ração padrão basal no BioDaq®.**

Medidas	Controle	Intervenção	P
Consumo em 24h (g)	20.61±1.99	17.97±0.57	0.111
Tamanho da refeição (g)	14.68±0.82	13.47±0.42	0,160
Número de refeições	7.22±0.48	7.12±0.29	0.855
Consumo ciclo escuro (g)	14.09± 1.37	11.65±0.48	0.047
Tamanho refeição ciclo escuro (g)	13.91±1,38	11.63±0,54	0.077
Número refeições ciclo escuro	6.16±0,60	5.98±0.39	0.795
Consumo ciclo claro (g)	5.01±1.21	5.87±0.64	0.493
Tamanho refeição ciclo claro (g)	4.24± 0.99	4.82±0.59	0.599
Número refeições ciclo claro	2.60± 0.32	2.63± 0.13	0.918

Teste t de *Student*; grupos controle (n=10) e intervenção (n=20); valores expressos em média ± EP; Houve diferença somente no ciclo escuro (p=0,047) entre os grupos no consumo de ração padrão.

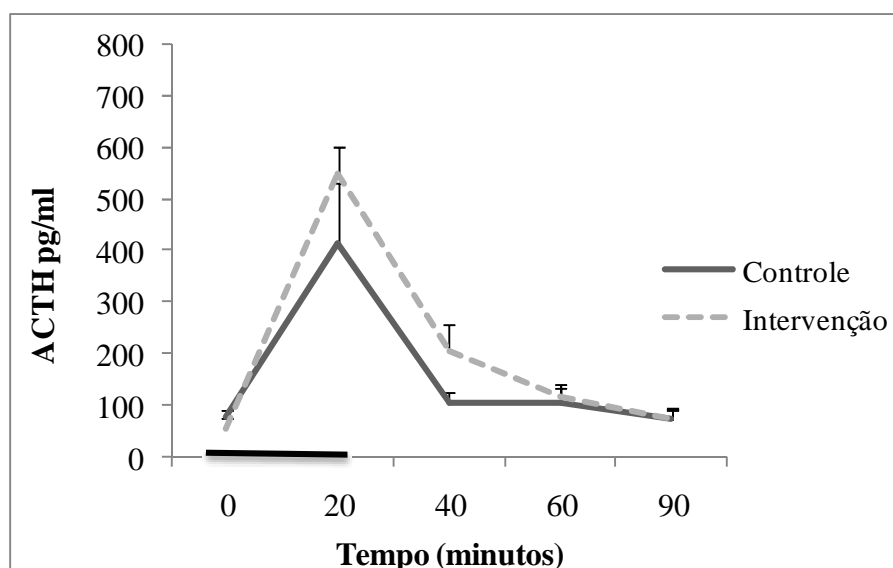
### 7.1.6 Resposta neuroendócrina ao estresse por contenção

Houve interação entre o grupo neonatal e o tempo nos níveis periféricos de corticosterona em resposta ao estresse [GEE, 11, 372: 4, p=0,02]. Houve efeito do tempo [GEE, 133, 103; 4, p<0,0001], não houve efeito isolado do grupo neonatal [GEE, 1, 293: 1, p=0,255] (figura 13).



**Figura 14 - Curva de corticosterona em resposta ao estresse em fêmeas controle (n=8) e fêmeas intervenção (n=8). A barra escura no eixo X representa o tempo de exposição ao estresse por contenção de movimentos. Dados expressos em média ± EP.**

Não houve interação entre o grupo neonatal e o tempo na produção de ACTH em resposta ao estresse [GEE, 5, 057: 4,  $p=0,282$ ]. Houve efeito do tempo [GEE, 103, 843: 4,  $p<0,0001$ ], o que não ocorreu com o grupo neonatal [GEE, 0, 0528: 1,  $p=0,467$ ] (figura 14).

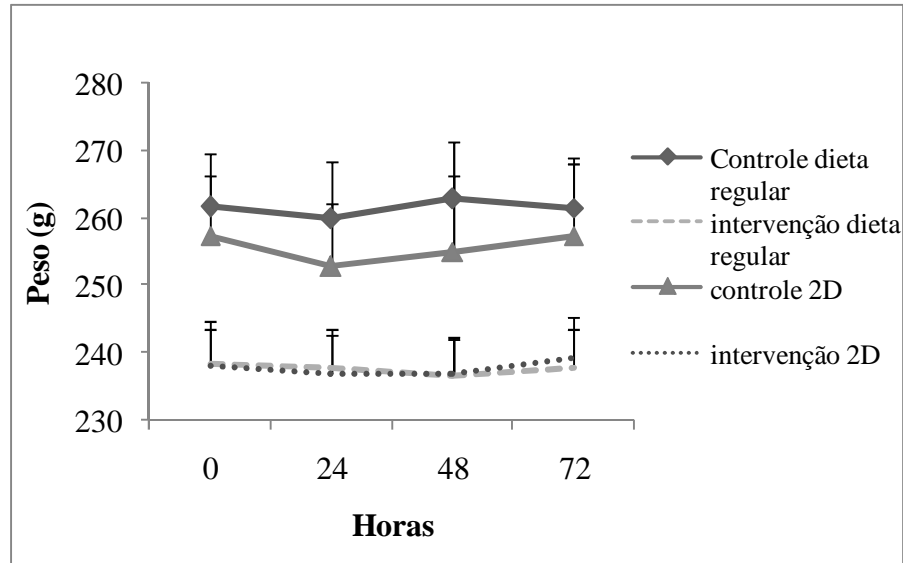


**Figura 15 - Curva de ACTH em resposta ao estresse nos tempos 0, 20, 40, 60 e 90 minutos em fêmeas controle (n=5-8) e fêmeas intervenção (n=4-8). A barra escura no eixo X representa o tempo de exposição ao estresse por contenção de movimentos. Dados expressos em média  $\pm$  EP.**

## 7.2 DIVISÃO DOS GRUPOS CONTROLE E INTERVENÇÃO NOS SUBGRUPOS DIETA REGULAR OU DIETA REGULAR + RAÇÃO PALATÁVEL

### 7.2.1 Peso corporal dos animais ao longo de 72h após o início dietas

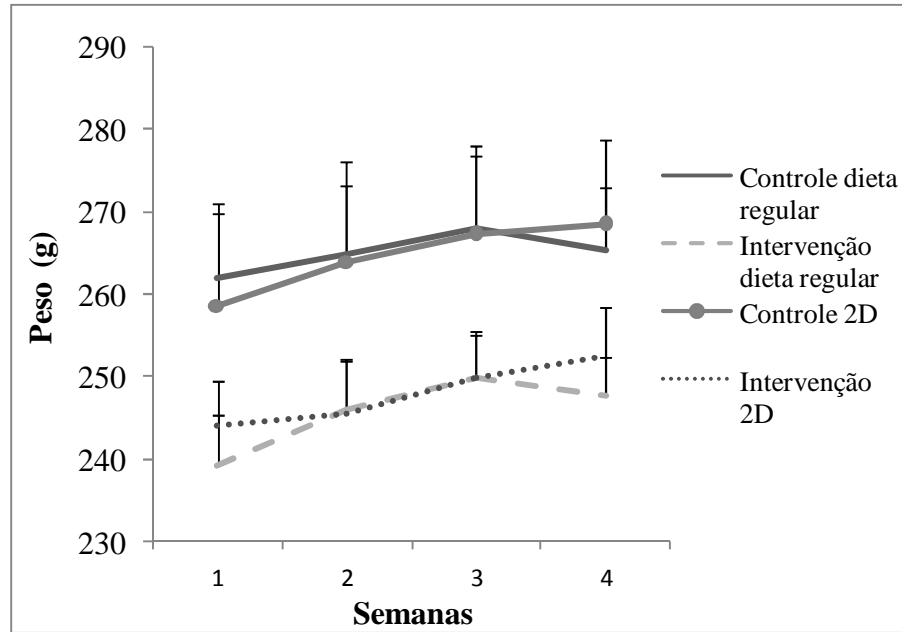
A ANOVA de medidas repetidas, utilizando o tamanho da ninhada como co-variável, demonstrou que não houve interação do tempo com o grupo neonatal [ $F(3, 75)=1,187$ ,  $p=0,320$ ] e nem do tempo com grupo dieta [ $F(3, 75)=0,958$ ,  $p=0,417$ ]. Houve efeito isolado somente do grupo neonatal [ $F(1, 25)=10,968$ ,  $p=0,003$ ], no qual os ratos do grupo intervenção mantiveram o peso menor em relação aos controles. Não houve efeito do tempo [ $F(3, 75)=3,75$ ,  $p=0,466$ ], nem do grupo dieta [ $F(1, 25)=0,22$ ,  $p=0,884$ ] (figura 15).



**Figura 16 - Peso dos grupos ao longo de 72h após o início das novas dietas. Grupo controle DR e 2D n=5, intervenção DR e 2D n=10; Dados expressos em média  $\pm$  EP. ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeito do grupo neonatal ( $p=0,003$ ), sem outros efeitos. (DR= dieta regular, 2D= dieta regular + dieta palatável, 0= dia do início das novas dietas).**

### 7.2.2 Peso ao longo de 4 semanas após o início das dietas

A ANOVA de medidas repetidas, utilizando o tamanho da ninhada como co-variável, demonstrou que não houve interação do tempo com o grupo neonatal [ $F(3, 75)=0,844$ ,  $p=0,474$ ] e nem com o grupo dieta [ $F(3, 75)=0,960$ ,  $p=0,416$ ]. Não houve efeito do tempo [ $F(3, 75)=0,967$ ,  $p=0,413$ ], somente do grupo neonatal [ $F(1, 25)=6,532$ ,  $p=0,0017$ ], com o grupo intervenção apresentando menor peso corporal em relação aos controles (figura 16).



**Figura 17 - Peso dos grupos ao longo de 4 semanas após o início das novas dietas. Grupo controle DR e 2D n=5, intervenção DR e 2D n=10; Dados expressos em média  $\pm$  EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do grupo ( $p=0,0017$ ), sem outros efeitos. DR= dieta regular, 2D= dieta regular + dieta palatável.**

### 7.2.3 Resultados dos consumos de ração entre os grupos

#### 7.2.3.1 Consumo de ração padrão ao longo de 4 semanas após inícios das dietas

A ANOVA de medidas repetidas demonstrou que ao longo das 4 semanas houve interação do tempo com o grupo dieta (dieta regular ou dieta regular + dieta palatável) [ $F(3, 78)=4,238, p=0,008$ ], conforme esperado. Houve também efeito do grupo neonatal [ $F(1, 26)=5,596, p=0,026$ ], sendo que o grupo intervenção apresentou menos consumo em relação aos controles. Por fim, houve efeito do grupo dieta como esperado [ $F(1, 26)=0,326, p<0,0001$ ], com menos consumo de ração regular nos grupos que tinham a opção da ração palatável. Não houve interação entre tempo e grupo neonatal [ $F(3, 78)=0,493, p=0,688$ ] nem efeito isolado do tempo [ $F(3, 78)=2,399, p=0,074$ ]. Não houve interação entre outras variáveis (figura 17).



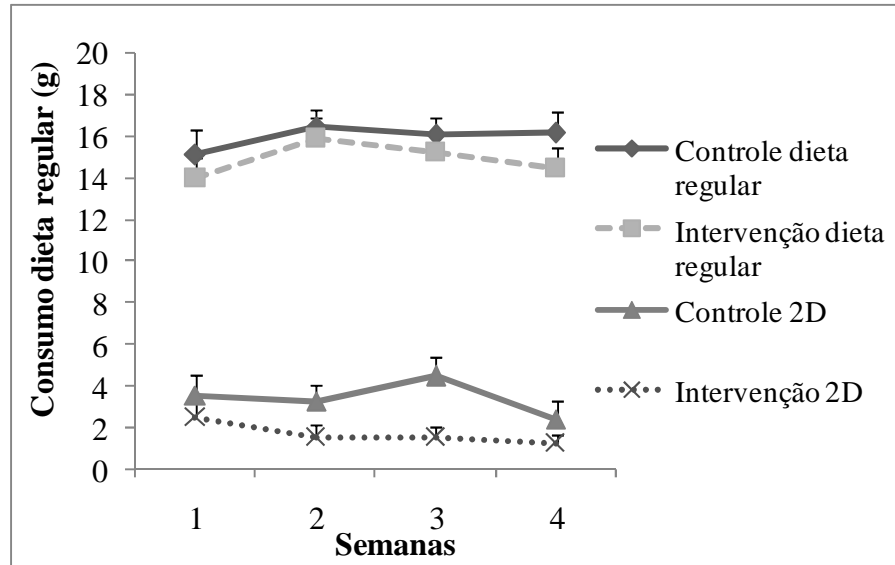


Figura 18 - Consumo de ração padrão entre os grupos ao longo de 4 semanas após o início das novas dietas. Grupo controle DR e 2D n=5, intervenção DR e 2D n=10. Dados expressos em média  $\pm$  EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou interação entre tempo e grupo dieta ( $p=0,008$ ), efeito do grupo neonatal ( $p=0,026$ ) e do grupo dieta ( $p<0,0001$ ) (DR= dieta regular, 2D= dieta regular + dieta palatável).

#### 7.2.3.2 Percentual consumida de dieta palatável ao longo das 4 semanas

A ANOVA de medidas repetidas, utilizando como co-variável o tamanho da ninhada e peso basal (antes do início das dietas), demonstrou que houve interação entre o consumo de alimento palatável ao longo do tempo com o grupo neonatal [ $F(3, 30)=4,764$ ,  $p=0,008$ ], no qual o grupo intervenção apresentou maior preferência pelo consumo do alimento palatável em relação aos controles ao longo do tempo. Também viu-se efeitos isolados do tempo  $F(3, 30)=4,001$ ,  $p=0,016$ ] e do grupo neonatal [ $F(1, 10)=12,167$ ,  $p=0,006$ ] (figura 18).

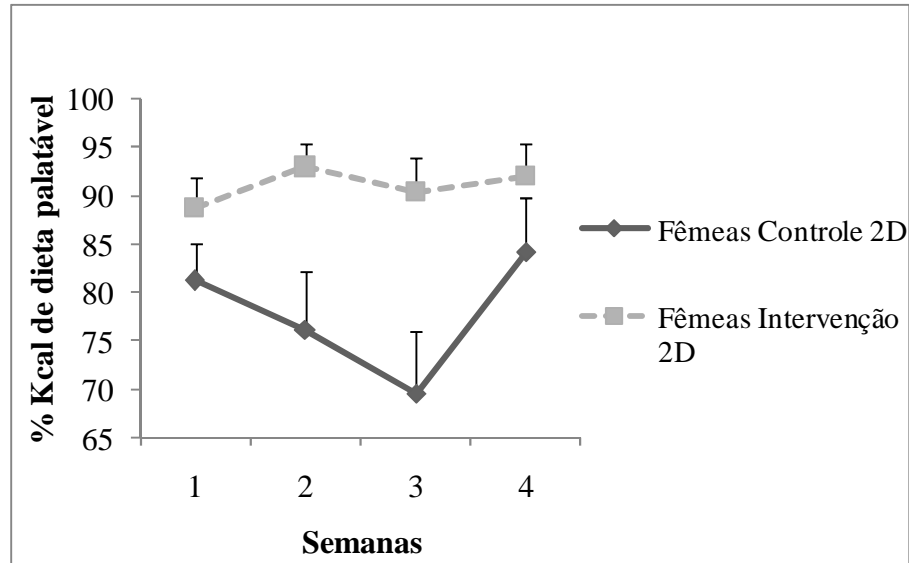


Figura 19 - Percentual de calorias de dieta palatável durante as semanas entre os grupos com duas opções de dietas. Grupo controle n=5, intervenção n=9. Dados expressos em média  $\pm$  EP. ANOVA de medidas repetidas demonstrou interação do tempo e grupo neonatal ( $p=0,008$ ), efeito do grupo neonatal ( $p=0,006$ ), tempo ( $p=0,016$ ). 2D= dieta regular + dieta palatável.

#### 7.2.3.3 Consumo no Teste de Preferência Alimentar

A ANOVA de duas vias demonstrou que houve efeitos isolados do grupo neonatal [ $F(1, 27)=4.859, p=0.037$ ] e do grupo dieta [ $F(1, 27)=4.897, p=0.037$ ] no teste de preferência. Além disso, há uma interação entre o grupo neonatal e o grupo dieta na preferência pela dieta palatável [ $F(1, 27)=13.718, p=0.001$ ]. Em controles, a exposição crônica à dieta palatável diminui a preferência por este alimento como esperado. No entanto, este efeito não foi visto no grupo intervenção (tabela 4).

**Tabela 4 - Percentual de dieta palatável consumida durante o Teste de Preferência alimentar por 24h no BioDaq®.**

Grupos	Média	Erro Padrão	P
Controle Dieta Regular	98,81 <sup>a</sup>	6,09	Ns
Controle 2 dietas	74,09 <sup>b</sup>	4,09	<0,0001
Intervenção Dieta Regular	92,55 <sup>a</sup>	3,80	Ns
intervenção 2 dietas	98,78 <sup>a</sup>	3,85	Ns

ANOVA de duas vias seguido de Teste Post Hoc de Bonferroni; controle DR (n=4), controle 2D (n=5), intervenção DR (n=9), intervenção 2D (n=10); valores expressos em média  $\pm$  EP; <sup>a,b</sup>letras distintas demonstram diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ). DR= dieta regular, 2D= dieta regular + dieta palatável.

### 7.3 Gordura abdominal

A análise da gordura abdominal como percentual do peso corporal, através da ANOVA de duas vias não demonstrou interação entre grupo neonatal e grupo dieta, nem efeito do grupo neonatal tanto na gordura retroperitoneal [F(1, 26)=1,953, p=0,174], quanto na gordura gonadal [F(1, 26)=0,980, p=0,331] e, conseqüentemente, no total de gordura abdominal [F(1, 26)=2,031, p=0,166]. Não houve efeito isolado do grupo neonatal [F(1, 26)=0,19, p=0,913] nem da dieta [F(1, 26)=0,9326, p=0,202]. Não houve outros efeitos ou interações no percentual de gordura abdominal, conforme apresentado na tabela 5.

**Tabela 5 - Percentual de gordura abdominal, conforme grupo neonatal e dieta.**

% gordura	Fêmeas Dieta Regular		Fêmeas Duas Dietas	
	Controle (n=5)	Intervenção (n=10)	Controle (n=5)	Intervenção (n=10)
<b>RetroP</b>	0,91±0,15	0,77±0,95	1,19±0,15	1,62±0,24
<b>Gonadal</b>	1,52±0,40	1,28±0,11	2,16±0,29	2,24±0,14
<b>Abd. Total</b>	2,43±0,55	2,05±1,06	3,35±0,44	3,86±0,38

ANOVA de duas vias; valores expressos em média ± EP; não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

RetroP: retroperitoneal; Abd. Total: abdominal total

### 7.4 Resultados preliminares da relação entre o cuidado materno e hormônios da tireóide na vida adulta entre os grupos

Ao analisar a correlação entre o escore LG, que reflete a qualidade do cuidado materno, e o nível plasmático de T3 na vida adulta entre os grupos, vemos que não há correlação entre estas variáveis nos grupos controle, mas sim nos grupos intervenção. Portanto, nos ratos do grupo intervenção, observou-se uma correlação negativa entre o escore

de LG observado no período neonatal e os níveis periféricos de T3 na vida adulta (quanto menor o LG no período neonatal, maior o T3 plasmático nas fêmeas adultas). No entanto, após a exposição crônica à dieta palatável, o grupo intervenção se iguala ao grupo controle e não se observa mais a correlação. Ver tabelas abaixo (6 e 7):

**Tabela 6 - Correlação entre LG e T3 nos grupos neonatais com ração padrão Nuvilab®.**

	<b>Ração Padrão</b>	
	<b>Controle (n=9)</b>	<b>Intervenção (n=5)</b>
<b>Correlação entre LG e T3</b>	0,638	-0,958
<b>P</b>	0,064	0,010*

Correlação de Pearson. Não foi observada correlação entre o LG, TSH e T4 em nenhum dos grupos (dados não mostrados). \* Resultados estatisticamente significativos (p=0.010).

**Tabela 7 - Correlação entre LG e T3 nos grupos dietas.**

	<b>Ração regular</b>		<b>Duas Dietas</b>	
	<b>Controle (n=5)</b>	<b>Intervenção (n=10)</b>	<b>Controle (n=5)</b>	<b>Intervenção (n=10)</b>
<b>Correlação entre LG e T3</b>	-0,553	-0,711	0,546	0,150
<b>P</b>	0,334	0,021*	0,341	0,679

Correlação de Pearson. Não foi observada correlação entre o LG, TSH e T4 em nenhum dos grupos (dados não mostrados). \* Resultados estatisticamente significativos (p=0.021).

## 8 DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho consistiram nos seguintes resultados relacionados ao grupo intervenção: (1) maior tempo das genitoras em postura de amamentação de menor qualidade, (2) menor peso corporal ao longo do tempo, (3) maior tempo de latência para ingerir alimento palatável conhecido num ambiente novo assim como menor consumo de ração padrão quando retornou a caixa moradia (NFST), (4) secreção de corticosterona diferenciada em resposta ao estresse, sendo mais responsivos ao estresse do que os controles, (5) menor consumo de ração padrão no ciclo escuro e (6) maior consumo de alimentos palatáveis (*comfort food*) quando expostos cronicamente à opção entre duas dietas (regular e palatável), porém (7) sem aumento de peso e da gordura abdominal (retroperitoneal e gonadal). Foi encontrada também uma correlação negativa entre T3 e o LG materno no grupo intervenção (8).

Em relação aos resultados do cuidado materno, viu-se que as genitoras do grupo intervenção despendem mais tempo nas posturas de amamentação menos arqueadas. Sabe-se que lesões na região da área pré-óptica medial inibem o comportamento maternal em ratos. Os estudos sugerem que o comportamento de recolhida e a construção do ninho ficam abolidos ou severamente prejudicados nestas lesões, porém não há consenso sobre os resultados da amamentação. Alguns estudos descrevem a completa eliminação de todos os comportamentos maternos após a lesão, enquanto outros afirmam que ainda encontram algum comportamento de amamentação, embora com menor duração em relação aos controles (NUMAN e INSEL, 2003). Alguns autores sugerem que os comportamentos de recolhida e construção do ninho são mais indicativos da motivação maternal, enquanto a amamentação pode ser mais indicativa de uma resposta maternal reflexa (STERN,1996), sendo

transitoriamente ativado como um reflexo quando a fêmea se coloca sobre os filhotes e eles se movem sobre ela.

Outros estudos importantes para evidenciar que a área pré-óptica medial promove atração para os filhotes e são os que mostram que implantes de estradiol ou prolactina nessa área podem promover o início do comportamento maternal. Esta área cerebral possui receptores para estes hormônios, assim como para a ocitocina, que também estimula o comportamento maternal (NUMAN e INSEL, 2003). Logo, é possível que o grupo intervenção apresente menor funcionalidade ou sensibilidade a estes hormônios nesta área, o que seria responsável pela amamentação de menor qualidade apresentada por este grupo.

A intervenção neonatal realizada (redução do material disponível para a confecção do ninho do dia 2 ao dia 9 de vida) resulta em menor variabilidade do cuidado materno dispensado pelas mães (MOLLE, 2011). A variabilidade deste tipo de comportamento (expressa através do LG materno) apresenta estreita relação com a resposta ao estresse na vida adulta da prole, uma vez que filhotes de mãe muito cuidadoras (maior LG) tendem a ser menos responsivos a situações de estresse quando comparado a mãe menos cuidadoras (menor LG) (LIU *et al.*, 1997). Esta característica pode ser explicada por alterações epigenéticas que levam a maior expressão de receptores GR de glicocorticóides no hipocampo (MEANEY *et al.*, 2000; WEAVER *et al.*, 2007). A baixa qualidade do cuidado materno diminui o LG e aumenta a frequência com que os filhotes são deixados sozinhos (IVY *et al.*, 2008). Além disso, neste trabalho, as genitoras do grupo intervenção exibem posições de amamentação menos eficazes. Já é conhecido que as mesmas ficam mais tempo no ninho, porém sem lambar ou amamentar os filhotes (MOLLE, 2011). É demonstrado neste mesmo modelo que as genitoras do grupo intervenção apresentam aumento das adrenais e dos níveis plasmáticos de corticosterona (IVY *et al.*, 2008). Logo, as mães do grupo intervenção podem

estar cansadas/“estressadas” pelo esforço de ficar mais tempo no ninho com os filhotes. E, talvez por isso exibam mais posturas do tipo 1 e 2 comparadas as controles.

A alteração da relação entre mãe-filhote associou-se com o desenvolvimento de comportamento ansioso na vida adulta demonstrado através do aumento do tempo de latência (comparado aos controles) para iniciar a ingestão alimento doce (Froot Loops®), ao qual haviam sido habituadas anteriormente (NSFT). Nosso estudo corrobora com achados já descritos, utilizando esse mesmo modelo animal, onde machos e fêmeas do grupo intervenção apresentam menor comportamento exploratório no labirinto em cruz elevada, indicando comportamento do tipo ansioso (MOLLE, 2011). Além disso, houve menor consumo de ração padrão (NSFT) pelo grupo intervenção quando recolocado em sua caixa-moradia habitual, com ração disponível, o que reforça o comportamento ansioso desse grupo. O teste de supressão alimentar pela novidade é considerado um paradigma relevante porque não requer um treinamento complexo e não é confundido por estímulos dolorosos, é simples de executar, sendo custo-efetivo (BELZUNG *et al.*, 2001; BLANCHARD *et al.*, 1998). É baseado num conflito, no qual o animal que foi privado de comida por um período de várias horas (entre 12-24h) enfrenta a opção de se aproximar e consumir um pedaço de alimento colocado no centro de uma arena desconhecida, aberta e iluminada, ou de ficar no canto da arena, evitando o centro deste ambiente ansiogênico. As duas medidas principais são latência para começar a comer no ambiente novo. Para maximizar a sensibilidade e reprodutibilidade do paradigma do comportamento alimentar, mais de uma medida deve ser avaliada; neste caso, a quantidade de ração consumida após 5 minutos do retorno deste animal para sua antiga caixa moradia (na qual foi colocada uma quantidade conhecida de ração padrão) também é verificada. Tanto a latência quanto o consumo se demonstram confiáveis (DULAWA e HEN, 2005).

Este é um teste de um comportamento relacionado à ansiedade e, portanto, animais experimentais com uma latência significativamente maior para comer do que animais controle

e que consomem menos ração ao retornar para a caixa-moradia são geralmente descritos como mais ansiosos (SAMUELS e HEN *et al.*, 2011). Muitas manipulações genéticas que resultam em fenótipos relacionados à ansiedade em roedores como o *knockout* para o receptor 5HT1A (GROSS *et al.*, 2002), *knockdown* para o receptor glicocorticóide (ROCHFORD *et al.*, 1997) e *knockout* para a substância P (SANTARELLI *et al.*, 2002) (16) exibem aumento de comportamento relacionado à ansiedade neste teste (DULAWA e HEN, 2005). Além disso, muitos fármacos com propriedades ansiolíticas como os benzodiazepínicos, barbitúricos e antagonistas beta-adrenérgicos diminuem a inibição comportamental neste teste (DULAWA e HEN, 2005). O tratamento agudo com benzodiazepínicos como diazepam, adinazolam, oxazepam, nitrazepam e lorazepam consistentemente revertem a inibição comportamental no teste de supressão alimentar pela novidade (SHEPHARD e BROADHURST, 1982; BODNOFF *et al.*, 1988; BODNOFF *et al.*, 1989; MERALI *et al.*, 2003). O antagonista GABA picrotoxina, que é ansiogênico (FILE, 1984), aumenta a inibição (SHEPHARD *et al.*, 1985). Logo, nossos resultados sugerem que os animais do grupo intervenção apresentam maior comportamento relacionado à ansiedade quando comparados aos controles.

Estudos demonstram que a depleção de serotonina leva a uma atenuação da resposta comportamental inibida num teste similar ao NSFT (BECHTHOLT *et al.*, 2007), sugerindo que alterações na neurotransmissão serotoninérgica podem estar envolvidas nos nossos achados. Estudos clássicos sobre estado de ansiedade demonstram que os níveis de serotonina estão aumentados durante o estresse, e alguns dos efeitos da 5HT são mediados pelo eixo HPA (CHAOULOFF, 2000). A serotonina desempenha importante função na neurogênese fetal assumindo mais tarde o papel de neurotransmissor. Ratos que receberam tratamento com um precursor da serotonina (que diminuiu discretamente a concentração cortical de 5HT) durante o período fetal e neonatal apresentaram um aumento na atividade exploratória na vida adulta,



o que pode ser considerado uma redução em um dos aspectos do comportamento ansioso. Entretanto, o tratamento com um inibidor da monoaminoxidase (enzima envolvida no metabolismo das monoaminas, como a 5HT), que levou a uma drástica redução na concentração cortical de serotonina, induziu um comportamento altamente ansiolítico e melhora na flexibilidade cognitiva (BLAZEVIC *et al.*, 2012 ). Portanto, a serotonina se torna um ponto interessante a ser investigado futuramente visto que é possível que existam alterações no sistema serotoninérgico nas fêmeas do grupo intervenção e, até onde sabemos, não existem investigações na literatura que relacionem sistema serotoninérgico nesse modelo de estresse neonatal.

A ansiedade é uma característica comumente induzida por modelos de estresse neonatal. Muitos trabalhos utilizam o modelo de separação materna e, dependendo do tempo de separação, há o comportamento ansioso/ou a inibição desse tipo de comportamento na vida adulta (LIU *et al.*, 2000; JHANG *et al.*, 2011). O estresse iniciado no período fetal reduz o cuidado maternal e leva ao desenvolvimento de ansiedade da prole (SMITH *et al.*, 2004). No presente modelo de estresse neonatal, a mãe está presente, porém não exibe o comportamento materno esperado, mimetizando situações de abuso e negligência em humanos, onde a mãe está presente, mas a qualidade do cuidado materno é pobre. Interessantemente, estudos demonstram que a falta de cuidado materno caloroso está relacionada com maior ansiedade dos filhos na vida adulta. A percepção de falta de cuidado materno é associada à maior incidência de depressão, ansiedade e baixa auto-estima em comparação a pessoas que relatam ter recebido médio ou alto cuidado (ENGERT *et al.*, 2010; PARKER, 1979). Mães de crianças ansiosas, independentemente de sua própria ansiedade, apresentam relação menos calorosas com seus filhos quando avaliadas em atividades comportamentais (MOORE *et al.*, 2004). Portanto, o cuidado materno recebido na infância parece ser impactante no desenvolvimento da ansiedade ao longo da vida tanto em humanos quanto em animais.

Além de estar relacionado à ansiedade, o modelo de restrição do material para confeccionar o ninho resulta em modificações do eixo HPA, como visto neste estudo. Outros estudos, utilizando o mesmo modelo, descrevem achados semelhantes no 9º dia de vida através do aumento dos níveis de corticosterona e peso adrenais (AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001; BRUNSON *et al.*, 2005), porém estas alterações não persistem aos 12 meses de idade (BRUNSON *et al.*, 2005). Outros modelos tais como separação materna também induzem alterações no eixo HPA (JAHNG, 2011). O estresse crônico na vida perinatal (separação materna prolongada) leva ao aumento do estado ansioso e depressivo, maiores níveis de corticosterona e ACTH, que são normalizados com a exposição crônica à dieta palatável (MANIAM e MORRIS, 2010). Em outros estudos, níveis elevados de ACTH e corticosterona estão presentes em resposta ao estresse crônico na vida adulta, porém, com a disponibilidade de *comfort foods*, esses níveis diminuem (PECORARO *et al.*, 2004). No presente estudo, não foram analisados os níveis de corticosterona e ACTH após a exposição crônica à dieta palatável. Sugere-se que o uso de alimento palatável module o eixo HPA, promovendo uma adaptação da resposta ao estresse, resultando em menores níveis de glicocorticóides e no acúmulo de gordura abdominal em roedores e em humanos (TOMIYAMA *et al.*, 2011; DALLMAN *et al.*, 2003; DALLMAN *et al.*, 2007). Os glicocorticóides estimulam o consumo de ração rica em gordura e açúcar (DALLMAN *et al.*, 2007) influenciando a pressão arterial, risco para obesidade e para psicopatologias. Portanto, como o estresse neonatal parece modular a secreção de glicocorticóides persistentemente, vê-se que a exposição a variações ambientais na vida precoce podem ser determinantes para definir o padrão de saúde dos indivíduos a longo prazo.

Interessantemente, com relação ao percentual de gordura abdominal no presente trabalho não houve diferença entre os grupos, mesmo após a exposição crônica à dieta palatável. É possível que o tempo de exposição tenha sido curto para induzir obesidade nestes

animais, já que eles pesavam menos em relação ao controle desde o desmame. Esse achado do peso corporal já foi visto em outros estudos utilizando o mesmo modelo (AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001), e merece futuras investigações. Possíveis mecanismos relacionados à regulação da temperatura corporal poderiam implicar no menor ganho de peso das fêmeas do grupo intervenção. Como a temperatura está relacionada ao cuidado materno (uma vez que é necessária temperatura ao redor dos 34°C para que a mãe exiba comportamento maternal) (STERN e JOHNSON, 1990), a precariedade do material oferecido na construção do ninho implica na dificuldade materna de manter a temperatura do ninho e, conseqüentemente, a temperatura corporal dos filhotes. Outros estudos mostram que a exposição ao frio no período precoce leva ao aumento da taxa metabólica de ratos com 30 dias de vida, menor peso corporal e aumento da capacidade termogênica com envolvimento do tecido marrom (SANT'ANNA e MORTOLA, 2002). Curiosamente, nesses estudos, a diferença de peso aparece após 2 semanas de estresse (momento do desmame, em que os animais passam a se alimentar com ração). O aparecimento dessa diferença, após o desmame, pode estar relacionado com mecanismos protetores do leite materno. O menor peso corporal parece ser consequência do mecanismo de defesa do organismo na tentativa de manter a temperatura corporal às custas do crescimento corporal (DAUNCEY *et al.*, 1983; SYMONDS *et al.* 1995). No presente trabalho, a diferença de peso corporal ao longo do tempo foi acompanhada e avaliada após o dia 21 de vida, momento em que ocorreu o desmame dos animais. No entanto, no mesmo modelo animal o menor ganho de peso nos animais do grupo intervenção já é visto no 9º dia de vida, sendo que, anteriormente ao momento da intervenção, esse grupo não diferia quanto ao peso corporal (AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001).

Se a diferença de peso entre os grupos aparece tão precocemente, é provável que as diferenças encontradas no consumo de ração padrão sejam mais uma consequência do menor peso corporal, do que sua causa. Interessantemente, a ingestão de ração padrão basal dos

animais não difere entre os grupos em geral, porém ao analisar detalhadamente o comportamento alimentar nota-se que no período escuro do ciclo (momento em que os ratos são mais ativos) esta diferença de consumo aparece. Isso mais uma vez nos sugere que questões relacionadas ao gasto energético estão envolvidas. Um estudo que também utilizou o BioDaq® constatou que a quantidade de calorias ingeridas durante o ciclo escuro, acompanhado durante 7 dias no equipamento, não diferiu entre os grupos estudados (resistente/não resistentes à obesidade) (FARLEY *et al.*, 2003). No nosso caso, a história neonatal destas fêmeas pareceu interferir no metabolismo a longo prazo, uma vez que o LG se correlacionou negativamente com os hormônios da tireóide na vida adulta, mas apenas no grupo intervenção. Apesar do número de animais utilizados ter sido pequeno, esta correlação nos sugere que possivelmente exista uma estreita relação entre o LG materno e o funcionamento do eixo HPT na vida adulta, o que poderia sinalizar uma programação do gasto energético destes animais, fazendo que eles ganhem menos peso ao longo da vida. O LG está intimamente ligado com a expressão gênica do receptor GR de glicocorticóide no hipocampo, modulando sua expressão através de mecanismos epigenéticos, ao facilitar a ligação do fator de transcrição NGFI-A com o sítio promotor de transcrição do gene para este receptor no DNA. Os principais mediadores destes efeitos são a serotonina e os hormônios da tireóide. Variações do cuidado materno (frequência do LG) produzem, através de uma variação periférica dos níveis de T3, o aumento da atividade da serotonina na rafe, desse modo iniciando a cascata de reações que culmina com a transcrição de GR. Os níveis de T3 não diferem entre mães *high* e *low*, porém nos filhotes das mães altamente cuidadoras há aumento de T3 plasmático, quando a mãe está em contato físico com filhote ou em LG; além disso, há também um aumento de T4 nos filhotes de mães altamente cuidadoras independente delas estarem ou não em contato com os filhotes no momento da coleta. Além disso, os filhotes de mães altamente cuidadoras possuem maior atividade da desidase no tecido

adiposo marrom em relação aos filhotes de mães pouco cuidadoras, o que sugere peculiaridades na conversão de T4 inativo para T3 ativo, sendo que filhotes de mães *high* convertem mais T4 em T3, independente de a mãe estar perto ou longe dos filhotes no momento da coleta. Logo, o cuidado materno influencia na capacidade de transformar T4 em T3 no tecido marrom (HELLSTROM *et al.*, 2012).

Curiosamente, nas fêmeas do grupo intervenção que receberam dieta palatável cronicamente, a correlação entre LG e T3 não é mais demonstrada. É possível que a correlação entre LG e T3 seja dependente da hiperreatividade do eixo HPA ao estresse como visto nas fêmeas intervenção. Como a dieta palatável inibe a atividade do eixo HPA como proposto por Dallman e colaboradores (DALLMAN *et al.*, 2003), isso explicaria por que a correlação não é mais vista no grupo intervenção que recebeu esta dieta de forma crônica.

Essas situações estressantes vivenciadas em animais e também em humanos num período de extrema vulnerabilidade parecem programar a preferência alimentar por determinados alimentos na vida adulta (PORTELLA *et al.*, 2012). No presente trabalho, o grupo intervenção prefere comer uma dieta rica em gordura e açúcar quando comparado ao grupo controle ao ser submetido cronicamente à opção de escolha entre dieta padrão e palatável durante a vida adulta. Além disso, quando exposto ao Teste de Preferência alimentar no BioDaq, o grupo controle apresenta diminuição da preferência pela dieta palatável após a exposição crônica, como esperado, o que não é visto no grupo intervenção. Sugere-se que os animais do grupo intervenção usem a dieta palatável para alívio da ansiedade e diminuição da resposta ao estresse, que é exacerbada nesse grupo como mostrada em nosso estudo.

A preferência por *comfort-food* consiste no consumo de alimentos saborosos, altamente palatáveis os quais induzem a sensação de prazer (DALLMAN *et al.*, 2003; DALLMAN *et al.*, 2004; DALLMAN *et al.*, 2010; MANIAM e MORRIS, 2010). Nosso grupo de pesquisa tem estudado o efeito de diferentes intervenções neonatais sobre

comportamento alimentar na vida adulta e visto que eventos estressantes, tanto pré (BARBIEIRI *et al.*, 2009, AYRES *et al.*, 2011, AYRES *et al.*, 2012) como pós-natais (SILVEIRA *et al.*, 2008) parecem induzir a preferência por alimento palatável na vida adulta, o que possivelmente se relacione com uma programação persistente do eixo HPA e de sua modulação sobre outros sistemas como o dopaminérgico mesolímbico (SILVEIRA *et al.*, 2010, revisão em Portella *et al.*, 2012). Nosso modelo também está associado com o consumo de alimento palatável, porém não com risco para obesidade. É possível que submetendo o animal ao estresse crônico na vida adulta, ou ao enfrentar situações de doença ou envelhecimento, essa relação se modifique.

O presente trabalho foi eficiente em reproduzir dados encontrados de estresse na vida precoce, alterações de comportamento materno e sua repercussão sobre o comportamento dos filhotes na vida adulta. Da mesma forma, destaca-se pelo uso de ratas fêmeas (nas quais essas relações são menos conhecidas) e a utilização de equipamento especializado e acurado para mensurar o padrão do consumo alimentar. Também, teve o cuidado de considerar o ciclo estral das fêmeas antes da coleta de tecidos, visto que está documentado na literatura que alterações hormonais podem interferir nos resultados encontrados (MARCONDES *et al.*, 2001). No entanto, este estudo também tem algumas limitações. Por exemplo, o ciclo estral das fêmeas no momento da realização no teste de supressão alimentar pela novidade não foi realizado. Assim como tempo de acompanhamento dos grupos dietas e o número de animais utilizados no estudo.

## 9 CONCLUSÃO

Neste trabalho mostrou-se que a intervenção neonatal realizada, que consistiu na redução do material disponível para a confecção do ninho do dia 2 ao dia 9 de vida dos filhotes, impossibilitando sua construção adequada, alterou o cuidado materno sendo eficiente, portanto, em reproduzir achados de modelos já existentes. Essa alteração na interação entre mãe e filhote associou-se com o desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso na vida adulta. A investigação de possíveis mecanismos relacionados ao desenvolvimento de ansiedade mostrou tanto o eixo HPA, com a produção diferenciada de corticosterona, quanto o eixo HPT, com a correlação entre T3 e LG, podem estar envolvidos na associação entre trauma precoce e ansiedade.

O grupo intervenção demonstrou menor crescimento corporal ao longo do tempo. E, ao ser exposto cronicamente a ração palatável, apresentou preferência por este tipo de alimento. Supreendentemente, apesar de preferir este alimento a ração padrão, não houve acúmulo de gordura abdominal. Possíveis implicações no metabolismo destes animais merecem ser investigados assim como maior tempo de exposição a dieta palatável. Quando tem somente a opção de ração padrão (avaliação no BiDaq® do consumo basal) o grupo intervenção neonatal ingere menos desse alimento no ciclo escuro comparado ao grupo controle.

A preferência pelo alimento palatável do grupo intervenção é uma provável forma de inibir os sintomas de ansiedade regulando eixo HPA, e possivelmente essa regulação ocorra concomitantemente com a regulação eixo HPT.

## 10 REFERÊNCIAS

1. Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav.* 2007;91(4):449-58.
2. Ahmed OM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones-neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *Int J Dev Neurosci.* 2010;28(6):437-54
3. Anderson GW, Schoonover CM, Jones SA. Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. *Thyroid.* 2003 Nov;13(11):1039-56.
4. Asbahr FR. Anxiety disorders in childhood and adolescence: clinical and neurobiological aspects. *J Pediatr (Rio J).* 2004 Apr;80 (2 Suppl):S28-34.
5. Avishai-Eliner S, Gilles EE, Eghbal-Ahmadi M, Bar-El Y, Baram TZ. Altered regulation of gene and protein expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis components in an immature rat model of chronic stress. *J Neuroendocrinol.* 2001;13(9):799-807.
6. Ayres C, Silveira PP, Barbieri MA, Portella AK, Bettiol H, Agranonik M, et al. Exposure to maternal smoking during fetal life affects food preferences in adulthood independent of the effects of intrauterine growth restriction. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease.* 2011;2(03):162-7.
7. Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP. Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr.* 2012;657379. PubMed PMID: 22851979. Pubmed Central PMCID: PMC3407636.
8. Balon R. Mood, anxiety, and physical illness: body and mind, or mind and body? *Depress Anxiety.* 2006;23(6):377-87.



9. Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, et al. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res*. 2009 Feb;65(2):215-20.
10. Bangasser DA, Curtis A, Reyes BA, Bethea TT, Parastatidis I, Ischiropoulos H, et al. Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Mol Psychiatry*. 2010;15(9):877, 96-904.
11. Bechtholt AJ, Hill TE, Lucki I. Anxiolytic effect of serotonin depletion in the novelty-induced hypophagia test. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 Mar;190(4):531-40.
12. Berce PJ, Moore BJ, Horwitz BA, Stern JS. Metabolism at thermoneutrality and in the cold is reduced in the neonatal preobese Zucker fatty (fa/fa) rat. *J Nutr*. 1986 Dec;116(12):2478-85.
13. Belzung C, El Hage W, Moindrot N, Griebel G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology*. 2001;41(3):400-8.
14. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*. 2001;125(1-2):141-9.
15. Benetti da SC, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, et al. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res*. 2007;62(4):405-11.
16. Blazevic S, Colic L, Culig L, Hranilovic D. Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. *Behav Brain Res*. 2012;230(1):175-81.
17. Blanchard RJ, Blanchard DC. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*. 1989 Mar;103(1):70-82.

18. Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001(a);25(3):205-18.
19. Blanchard RJ, Hebert MA, Ferrari PF, Palanza P, Figueira R, Blanchard DC, et al. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiol Behav.* 1998;65(2):201-9.
20. Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav.* 2001(b);73(3):261-71.
21. Blanchard RJ, Yang M, Li CI, Gervacio A, Blanchard DC. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001(c);25(7-8):587-95.
22. Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology.* 1988;95:298-302.
23. Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl).* 1989;97(2):277-9.
24. Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Alves SB, Reis AM, de Moura EG. Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. *J Endocrinol.* 2008;198(2):331-7.
25. Bouffleur N, Antoniazzi CT, Pase CS, Benvegna DM, Barcelos RC, Dolci GS, et al. Neonatal tactile stimulation changes anxiety-like behavior and improves responsiveness of rats to diazepam. *Brain Res.* 2012;1474:50-9.
26. Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. In: Ministério do Planejamento OeG, editor.: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Ministério da Saúde; 2011.

27. Brunson KL, Kramar E, Lin B, Chen Y, Colgin LL, Yanagihara TK, et al. Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *J Neurosci*. 2005;25(41):9328-38.
28. Buwalda B, Blom WA, Koolhaas JM, van Dijk G. Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. *Physiol Behav*. 2001;73(3):371-7.
29. Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 28;95(9):5335-40.
30. Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*. 2003;79(3):359-71.
31. Chaouloff F. Serotonin, stress and corticoids. *J Psychopharmacol*. 2000 Jun;14(2):139-51.
32. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012. Oct 1;39(1):112-9.
33. Carvin CD, Parr RD, Kladde MP. Site-selective in vivo targeting of cytosine-5 DNA methylation by zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res*. 2003 Nov 15;31(22):6493-501.
34. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*. 2003;463(1-3):235-72.
35. Cullinan WE, Ziegler DR, Herman JP. Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct Funct*. 2008 Sep;213(1-2):63-72.

36. Dalle Molle R, Krolow R, de Jesus RB, Portella AK, Dalmaz C, Manfro GG, et al. Produção de óxido nítrico no hipocampo: investigação do envolvimento da óxido nítrico sintase neuronal no desenvolvimento de comportamentos ansiosos em animais submetidos a estresse neonatal. *Revista HCPA*. 2012 27/04/2012;32(1).
37. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(20):11696-701.
38. Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF. Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology*. 2004;145(6):2633-8.
39. Dallman MF, Warne JP, Foster MT, Pecoraro NC. Glucocorticoids and insulin both modulate caloric intake through actions on the brain. *J Physiol*. 2007 Sep 01;583(Pt 2):431-6.
40. Dallman MF. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(3):159-65.
41. Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis*. 2004 Jun;19(1-2):3-14.
42. Dauncey MJ, Ingram DL, Walters DE, Legge KF, Dauncey MJ, Ingram DL, et al. Evaluation of the effects of environmental temperature and nutrition on growth and development. *The Journal of Agricultural Science*. 1983 1983/10/01;101(02):291-9.
43. Davis M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry*. 1998;44(12):1239-47.
44. DeSantis SM, Baker NL, Back SE, Spratt E, Ciolino JD, Moran-Santa Maria M, et al. Gender differences in the effect of early life trauma on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning. *Depress Anxiety*. 2011 May;28(5):383-92

45. de Oliveira E, de Moura EG, Santos-Silva AP, Pinheiro CR, Claudio-Neto S, Christian Manhaes A, et al. Neonatal hypothyroidism caused by maternal nicotine exposure is reversed by higher T3 transfer by milk after nicotine withdraw. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):2068-73.
46. Dulawa SC, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(4-5):771-83.
47. Duval F, Mokrani MC, Lopera FG, Diep TS, Rabia H, Fattah S. Thyroid axis activity and suicidal behavior in depressed patients. *Psychoneuroendocrinology.* 2010;35(7):1045-54. PubMed PMID: 20129737. eng.
48. Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97(2):61-73.
49. Ely DR, Dapper V, Marasca J, Correa JB, Gamaro GD, Xavier MH, et al. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav.* 1997;61(3):395-8.
50. Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1991 Apr 15;266(11):7182-8.
51. Engert V, Efanov SI, Dedovic K, Duchesne A, Dagher A, Pruessner JC. Perceived early-life maternal care and the cortisol response to repeated psychosocial stress. *J Psychiatry Neurosci.* 2010;35(6):370-7.
52. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 2001;26(1):37-49.
53. Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97(2):61-73.

54. Fachin A, Silva RK, Noschang CG, Pettenuzzo L, Bertinetti L, Billodre MN, et al. Stress effects on rats chronically receiving a highly palatable diet are sex-specific. *Appetite*. 2008;51(3):592-8.
55. Farley C, Cook JA, Spar BD, Austin TM, Kowalski TJ. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obes Res*. 2003 Jul;11(7):845-51.
56. File SE. New strategies in the search for anxiolytics. *Drug Des Deliv*. 1990 Mar;5(3):195-201.
57. File SE. Recent developments in anxiety, stress, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;54(1):3-12.
58. File SE, Lister RG. Do the reductions in social interaction produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? *Neuropharmacology*. 1984 Jul;23(7A):793-6.
59. Franklin TB, Linder N, Russig H, Thony B, Mansuy IM. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. *PLoS One*. 2011;6(7):e21842.
60. Fregly MJ. Activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during exposure to cold. *Pharmacol Ther*. 1989;41(1-2):85-142.
61. Gene-Jack W. Handbook of Behavior, Food and Nutrition. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR, editors. *Gender Differences in Brain Activation by Food Stimulation*: Springer US; 2010. p. 505-13.
62. Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, et al. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*. 2002;416(6879):396-400.
63. Halasz I, Rittenhouse PA, Zorrilla EP, Redei E. Sexually dimorphic effects of maternal adrenalectomy on hypothalamic corticotrophin-releasing factor,

- glucocorticoid receptor and anterior pituitary POMC mRNA levels in rat neonates. 1997 18 June 1997;100(2):198–204.
64. Haltmeyer GC, Denenberg VH, Zarrow MX. Modification of the plasmacorticosterone response as a function of infantile stimulation and electric shock parameters ☆. 1967 January 1967;2(1):61–3.
  65. Hammen C, Kim EY, Eberhart NK, Brennan PA. Chronic and acute stress and the prediction of major depression in women. *Depress Anxiety*. 2009;26(8):718-23.
  66. Helmreich DL, Crouch M, Dorr NP, Parfitt DB. Peripheral triiodothyronine (T(3)) levels during escapable and inescapable footshock. *Physiol Behav*. 2006;87(1):114-9.
  67. Helmreich DL, Tylee D. Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. *Horm Behav*. 2011;60(3):284-91.
  68. Hellstrom IC, Dhir SK, Diorio JC, Meaney MJ. Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone-serotonin-NGFI-A signalling cascade. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1601):2495-510.
  69. Herman JP, Figueiredo HF, Mueller NK, Ostrander MM, Zhang R, Tauchi M, et al. Neurochemical Systems Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. In: Lajtha A, Blaustein J, editors. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*: Springer US; 2007. p. 513-69.
  70. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 1997;20(2):78-84.
  71. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(3):151-80.

72. Ito JM, Valcana T, Timiras PS. Effect of hypo- and hyperthyroidism on regional monoamine metabolism in the adult rat brain. *Neuroendocrinology*. 1977;24(1):55-64.
73. Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*. 2008;154(3):1132-42.
74. Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid*. 2005 Aug;15(8):757-68.
75. Jahng JW. An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Horm Behav*. 2011;59(2):213-20.
76. Jones A, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Gouliden P, Phillips DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1868-71
77. Kirschbaum C, Klauer T, Filipp SH, Hellhammer DH. Sex-specific effects of social support on cortisol and subjective responses to acute psychological stress. *Psychosom Med*. 1995 Jan-Feb;57(1):23-31.
78. Krolow R, Noschang CG, Arcego D, Andrezza AC, Peres W, Goncalves CA, et al. Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite*. 2010;55(1):108-16.
79. Kuo JR, Goldin PR, Werner K, Heimberg RG, Gross JJ. Childhood trauma and current psychological functioning in adults with social anxiety disorder. *J Anxiety Disord*. 2011;25(4):467-73.
80. Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH. Physiological and behavioral effects of infantilestimulation. *Physiology & Behavior*. 1967;2(1):55-9.



81. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997 Sep 12;277(5332):1659-62.
82. Lonstein JS, Simmons DA, Swann JM, Stern JM. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience*. 1998;82(1):267-81.
83. Loomans EM, van der Stelt O, van Eijsden M, Gemke RJ, Vrijkotte T, den Bergh BR. Antenatal maternal anxiety is associated with problem behaviour at age five. *Early Hum Dev*. 2011;87(8):565-70.
84. Manfro GG, Hospital das Clínicas de Porto Alegre PA, Brasil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul PA, Brasil, Isolan L, Hospital das Clínicas de Porto Alegre PA, Brasil, Blaya C, et al. Retrospective study of the association between adulthood panic disorder and childhood anxiety disorders. *Rev Bras Psiquiatr*. 2002 03/2002;24(1):26-9.
85. Maniam J, Morris MJ. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(5):717-28.
86. Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*. 2001;74(4-5):435-40.
87. Matteri RL, Becker BA. Somatotroph, lactotroph and thyrotroph function in three-week-old gilts reared in a hot or cool environment. *Domest Anim Endocrinol*. 1994;11(2):217-26.
88. Mathieu G, Oualian C, Denis I, Lavialle M, Gisquet-Verrier P, Vancassel S. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation together with early maternal separation increases anxiety and vulnerability to stress in adult rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011;85(3-4):129-36.

89. McClelland S, Korosi A, Cope J, Ivy A, Baram TZ. Emerging roles of epigenetic mechanisms in the enduring effects of early-life stress and experience on learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;96(1):79-88.
90. McEwen BS. Stress and Neuronal Plasticity. In: Fink G, editor. *Stress Science Neuroendocrinology*: Elsevier; 2009. p. 455-8.
91. McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999 Mar 12;113(1-2):97-106.
92. McLaughlin KA, Kubzansky LD, Dunn EC, Waldinger R, Vaillant G, Koenen KC. Childhood social environment, emotional reactivity to stress, and mood and anxiety disorders across the life course. *Depress Anxiety.* 2010 Dec;27(12):1087-94.
93. MacMillan HL, Fleming JE, Streiner DL, Lin E, Boyle MH, Jamieson E, et al. Childhood abuse and lifetime psychopathology in a community sample. *Am J Psychiatry.* 2001 Nov;158(11):1878-83.
94. Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1161-92
95. Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Weaver S, Yau J, Chapman K, et al. Postnatal Handling Increases the Expression of cAMP-Inducible Transcription Factors in the Rat Hippocampus: The Effects of Thyroid Hormones and Serotonin. *The Journal of Neuroscience.* 2000 05/15/2000;20(10):3926-35.
96. Meaney MJ, Szyf M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci.* 2005;7(2):103-23.

97. Mello MF, Faria AA, Mello AF, Carpenter LL, Tyrka AR, Price LH. Childhood maltreatment and adult psychopathology: pathways to hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction. *Rev Bras. Psiquiatr.* 2009 Oct;31 Suppl 2:S41-8.
98. Merali Z, Levac C, Anisman H. Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. *Biol Psychiatry.* 2003;54(5):552-65.
99. Miczek KA, Yap JJ, Covington HE, 3rd. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther.* 2008;120(2):102-28.
100. Min W, Liu C, Yang Y, Sun X, Zhang B, Xu L. Alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal/thyroid (HPA/HPT) axes correlated with the clinical manifestations of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012; Oct 1;39(1):206-11.
101. Mikolajczyk RT, El Ansari W, Maxwell AE. Food consumption frequency and perceived stress and depressive symptoms among students in three European countries. *Nutr J.* 2009;8:31.
102. Molle, Roberta Dalle. Estudo translacional sobre a qualidade do cuidado materno em resposta ao estresse neonatal, sua associação com ansiedade na vida adulta e investigação de potenciais mecanismos envolvidos. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/31882>>. Acesso em: 06 agosto 2012.
103. Moore PS, Whaley SE, Sigman M. Interactions between mothers and children: impacts of maternal and child anxiety. *J Abnorm Psychol.* 2004;113(3):471-6.
104. Nolte T, Guiney J, Fonagy P, Mayes LC, Luyten P. Interpersonal stress regulation and the development of anxiety disorders: an attachment-based developmental framework. *Front Behav Neurosci.* 2011;5:55. PubMed PMID: 21960962. Pubmed Central PMCID: PMC3177081.

105. Numan M, Insel TR. *The Neurobiology of Parental Behavior*. 1<sup>a</sup> ed: New York:Springer; 2003.
106. Nunes MT. Thyroid hormones: mechanism of action and biological significance. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003 12/2003;47(6):639-43.
107. Ordian NE, Pivina SG, Fedotova Iu O, Rakitskaia VV. [Prenatal stressed female rats develop stable anxious and depressive state in experimental model of post-traumatic stress disorder]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2011 Nov;97(11):1187-95.
108. Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci*. 2001 Dec;115(6):1332-40.
109. Parker G. Reported parental characteristics in relation to trait depression and anxiety levels in a non-clinical group. *Aust N Z J Psychiatry*. 1979 Sep;13(3):260-4.
110. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*. 2004;145(8):3754-62.
111. Plotsky PM, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(12):2192-204.
112. Pompili M, Gibiino S, Innamorati M, Serafini G, Del Casale A, De Risio L, et al. Prolactin and thyroid hormone levels are associated with suicide attempts in psychiatric patients. *Psychiatry Res*. 2012. PubMed PMID: 22748186.
113. Portella AK, Kajantie E, Hovi P, Desai M, Ross MG, Goldani MZ, et al. Effects of in utero conditions on adult feeding preferences. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2012 2012/06/01;3(03):140-52.

114. Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol.* 2001;38(4):239-51.
115. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology.* 2008;149(10):4892-900.
116. Rochford J, Beaulieu S, Rouse I, Glowa JR, Barden N. Behavioral reactivity to aversive stimuli in a transgenic mouse model of impaired glucocorticoid (type II) receptor function: effects of diazepam and FG-7142. *Psychopharmacology (Berl).* 1997 Jul;132(2):145-52.
117. Rodrigues AJ, Leao P, Carvalho M, Almeida OF, Sousa N. Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress. *Psychopharmacology (Berl).* 2011 Mar;214(1):107-20.
118. Samuels BA, Hen R. Novelty-Suppressed Feeding in the Mouse. In: Gould TD, editor. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests* 2011. p. 107-21.
119. Sant'Anna GM, Mortola JP. Thermal and respiratory control in young rats exposed to cold during postnatal development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003;134(2):449-59.
120. Santarelli L, Gobbi G, Blier P, Hen R. Behavioral and physiologic effects of genetic or pharmacologic inactivation of the substance P receptor (NK1). *J Clin Psychiatry.* 2002;63 Suppl 11:11-7.
121. Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 1986 Mar;396(1):64-76.
122. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000 Feb;21(1):55-89.

123. Severino GS, Fossati IA, Padoin MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav.* 2004;81(3):489-98.
124. Shephard RA, Broadhurst PL. Effects of diazepam and of serotonin agonists on hyponeophagia in rats. *Neuropharmacology.* 1982 Apr;21(4):337-40.
125. Shephard RA, Stevenson D, Jenkinson S. Effects of valproate on hyponeophagia in rats: competitive antagonism with picrotoxin and non-competitive antagonism with RO 15-1788. *Psychopharmacology (Berl).* 1985;86(3):313-7.
126. Silveira PP, da Silva Benetti C, Ayres C, Pederiva FQ, Portella AK, Lucion AB, et al. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav Brain Res.* 2006;173(2):205-10.
127. Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci.* 2010;28(1):111-8.
128. Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23(1):93-9.
129. Silveira PP, Portella AK, Crema L, Correa M, Nieto FB, Diehl L, et al. Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. *Physiol Behav.* 2008;93(4-5):877-82.
130. Smith JW, Seckl JR, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2004;29(2):227-44.
131. Smythe JW, Rowe WB, Meaney MJ. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT<sub>2</sub> receptor binding in selected brain regions: relationship to the

- handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994 Jul 15;80(1-2):183-9.
132. Steimer T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci*. 2002 Sep;4(3):231-49.
133. Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(4):495-506.
134. Stern JM, Johnson SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol Behav*. 1990;47(5):993-1011.
135. Stern JM. Somatosensation and Maternal Care in Norway Rats. In: J. S. Rosenblatt & C. T. Snowdon, editor: *Advances in the Study of Behavior*. 1996;25:243-94.
136. Symonds ME, Andrews DC, Buss DS, Clarke L, Darby CJ, Johnson P, et al. Environmental effects on thermoregulation and breathing patterns during early postnatal development in hand-reared lambs. *Exp Physiol*. 1995 Sep;80(5):779-92.
137. Tannenbaum B, Rowe W, Sharma S, Diorio J, Steverman A, Walker M, et al. Dynamic variations in plasma corticosteroid-binding globulin and basal HPA activity following acute stress in adult rats. *J Neuroendocrinol*. 1997 Mar;9(3):163-8.
138. Ter Horst JP, de Kloet ER, Schachinger H, Oitzl MS. Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. *Cell Mol Neurobiol*. 2012 Jul;32(5):725-35.
139. Tomiyama AJ, Dallman MF, Epel ES. Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(10):1513-9.

140. Trickett PK, Noll JG, Susman EJ, Shenk CE, Putnam FW. Attenuation of cortisol across development for victims of sexual abuse. *Dev Psychopathol.* 2010;22(1):165-75.
141. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(5):355-67.
142. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002;53(4):865-71.
143. Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Herman JP. HPA axis dampening by limited sucrose intake: reward frequency vs. caloric consumption. *Physiol Behav.* 2011;103(1):104-10.
144. Voloschin LM, Tramezzani JH. Relationship of prolactin release in lactating rats to milk ejection, sleep state, and ultrasonic vocalization by the pups. *Endocrinology.* 1984 Feb;114(2):618-23.
145. Walker CD. Maternal touch and feed as critical regulators of behavioral and stress responses in the offspring. *Dev Psychobiol.* 2010 Nov;52(7):638-50.
146. Wang G-J. Handbook of Behavior, Food and Nutrition. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR, editors. *Gender Differences in Brain Activation by Food Stimulation*: Springer US; 2010. p. 505-13.
147. Wang G-J, gjwang@bnl.gov, Volkow ND, Telang F, Jayne M, Ma Y, et al. Evidence of gender differences in the ability to inhibit brain activation elicited by food stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009 01/27/2009 106(4):1249-54.
148. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004;7(8):847-54.



149. Weber K, Rockstroh B, Borgelt J, Awiszus B, Popov T, Hoffmann K, et al. Stress load during childhood affects psychopathology in psychiatric patients. *BMC Psychiatry*. 2008;8:63.
150. Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol*. 2001;13(2):113-28.
151. Welch CC, Kim EM, Grace MK, Billington CJ, Levine AS. Palatability-induced hyperphagia increases hypothalamic Dynorphin peptide and mRNA levels. *Brain Res*. 1996;721(1-2):126-31.
152. Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol*. 2001;26(1):67-77.
153. Yau JL, Noble J, Widdowson J, Seckl JR. Impact of adrenalectomy on 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;45(1):182-6.
154. Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. 2003 May 2003;68(5):439–45.
155. Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, et al. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci*. 2010;30(7):2433-41.

## **11 INFORMAÇÕES SOBRE ARTIGO SUBMETIDO**

O presente trabalho gerou um artigo, até o momento, o qual está em processo de publicação.