

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

A INFLUÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS
POLIINSATURADOS EM ASPECTOS
METABÓLICOS E DE CRESCIMENTO
INTRAUTERINO: ESTUDO TRANSLACIONAL

TESE DE DOUTORADO

JULIANA ROMBALDI BERNARDI

Porto Alegre, Brasil, 2013.

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

A INFLUÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS
POLIINSATURADOS EM ASPECTOS
METABÓLICOS E DE CRESCIMENTO
INTRAUTERINO: ESTUDO TRANSLACIONAL

JULIANA ROMBALDI BERNARDI

Orientador: Prof. Drº. Marcelo Zubaran Goldani

A apresentação dessa tese 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 Doutor.

Porto Alegre, Brasil, 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Rombaldi Bernardi, Juliana

A INFLUÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS EM ASPECTOS METABÓLICOS E DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO: ESTUDO TRANSLACIONAL / Juliana Rombaldi Bernardi. -- 2013.

153 f.

Orientador: Marcelo Zubaran Goldani.

Tese (Doutorado) -- 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, 2013.

1. Pesquisa Translacional. 2. Ácidos Graxos Ômega-3. 3. Peso ao Nascer. 4. Estresse Metabólico. I. Zubaran Goldani, Marcelo, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

29/08/2013

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbieri

Universidade de São Paulo

Profª Dra. Michele Drehmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Fernanda Urruth Fontella

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Dedico esta tese a minha mãe Marilene,
a meu pai João Paulo,
a minha irmã Fernanda
e a meu noivo Fernando,
pois no meio de tanto estresse e
deficiência nutricional,
me propiciaram um ambiente protetor
e cheio de carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização dessa tese:

Ao professor Marcelo Zubaran Goldani, meu orientador, pelos ensinamentos, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar no grupo de pesquisa e participar desde a elaboração da coorte IVAPSA;

À professora Patrícia Pelufo Silveira, pela oportunidade de iniciar a vida na linha experimental e pelas incentivadoras conversas profissionais e conselhos pessoais;

À minha família (pai João Paulo, mãe Marilene, irmã Fernanda e seu namorado Felipe), suporte para que tudo pudesse acontecer, não há palavras suficientes nesta vida para agradecer todo o apoio. Minha “energia” recarrega a cada ida a Caxias;

Ao meu noivo Fernando, pelo amor, paciência e otimismo, que me proporcionou o equilíbrio mental e emocional nos momentos mais necessários; e à sua família (Caio, Ana, Carlos e Ana Paula), pelo incentivo, carinho em todos os momentos em que eu precisei e sempre poder comemorar a luta. Considero-os minha família de Porto Alegre;

Ao amigo Charles F. Ferreira, pela convivência e amizade que rendeu muitas histórias, aprendizados e 4 artigos (seguindo contando);

À amiga Emily de Conto, pela amizade e sempre super ajuda na parte genética da qualificação e tese;

À amiga Cristiane Melere, sempre presente em minha vida, me auxiliou muito em conselhos pessoais e nos cálculos do QFA da tese;

Aos queridos amigos Daiane Vanzin, Diego Carrilho, Gissele Ana Finimundi, Thais Faggion, que em seus mais variados contextos, cidades, intensidades e períodos, foram fundamentais e essenciais para a sanidade emocional e mental;

Ao professor Luis Fernando Moreira, pela disponibilidade em me transmitir excelentes ensinamentos na área da pesquisa;

Aos professores Carla Dalmaz, Clécio H. da Silva, Valdeni Zani, Vera Bosa, pelos exemplos de profissionais;

Aos integrantes do NESCA (Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente) e grupo coorte IVAPSA, pela parceria na coleta de dados e incentivo para a realização desta tese;

Aos colegas de profissão, professores da UCS e Cenequista, pela “abertura” ao mundo da docência e por me proporcionarem momentos mágicos e gratificantes;

Aos alunos, que nesses 3 anos me proporcionaram aprendizados incríveis;

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), seus demais setores (UEA, CPC); e ao laboratório 37 (Departamento de Bioquímica) por viabilizar esse trabalho;

À Universidade (UFRGS), pela oportunidade de realizar o Edital de Curta Duração, conhecer o *Monell Chemical Senses Center* na Filadélfia e noivar em Nova York;

Ao Programa de Pós-Graduação (PPG) da Saúde Criança e do Adolescente, pela viabilidade em realizar esse trabalho;

Por fim, às famílias da coorte, pelos aprendizados proporcionados não encontrados em livros ou artigos científicos, desejo que continuem fazendo parte deste seguimento.

RESUMO

Introdução: Nos últimos vinte anos, estudos clínicos e experimentais demonstraram que as variações do ambiente materno (como o estresse precoce) associado à deficiência nutricional podem influenciar na saúde do indivíduo.

Objetivo clínico: Determinar o impacto da interação entre o consumo alimentar das gestantes com o crescimento intrauterino em uma coorte de nascimentos.

Objetivo experimental: Avaliar se o estresse neonatal, como a separação materna, interage com a deficiência nutricional de ácidos graxos (AG) poliinsaturados ômega-3 ao longo da vida em aspectos metabólicos em ratos adultos.

Metodologia clínica: Trata-se de uma coorte envolvendo o recrutamento de nascimentos ocorridos nos hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Mães de diferentes históricos clínicos (hipertensão-GHAS, diabetes-GDM, tabagismo-GTAB, crianças com restrição de crescimento intrauterino por razão idiopática-GRCIU e controles-GCON) foram convidadas a participar 24 horas após o nascimento da criança. Foram utilizadas as variáveis da entrevista do pós-parto (sociodemográficas e antropométricas das mães e dos recém-nascidos-RNs) e domiciliar aos 7 dias de vida da criança (questionário de frequência alimentar). A coorte está em andamento para outros acompanhamentos (15 dias e 1, 3 e 6 meses de vida da criança). O tamanho da amostra final constitui-se de, no mínimo, 20 pares mãe-RNs por grupo e 150 indivíduos no total.

Metodologia experimental: Os filhotes de ratos foram randomizados em: Grupo Separação Materna (GSM) e Grupo Não-Manipulado (GNM), sendo filhotes separados removidos de suas mães durante 3 horas diárias do dia 1º ao 10º pós-natal (DPN) e colocados em incubadora a 32°C. No DPN 35, os machos foram subdivididos em dois grupos de acordo com dieta adequada ou deficiente em AG poliinsaturados ômega-3,

nas subseqüentes 15 semanas de vida. O peso corporal e o consumo alimentar dos ratos eram mensurados semanalmente e ao final do tratamento as amostras de tecidos foram coletadas.

Resultados clínicos: Entre Setembro de 2011 a Julho de 2013, 255 puérperas foram elegíveis para o estudo, sendo que 218 (14,5%) aceitaram participar e 182 (16,5%) apresentavam dados completos para análise. Ao comparar-se as puérperas elegíveis com as recusas (n=37) não houve diferenças significativas entre qualquer variável, entretanto, as puérperas do seguimento apresentaram média de idade superior em relação às perdas (p=0,010). O GHAS apresentou média de idade superior em relação ao GTAB e GRCIU (p=0,007), já o GRCIU apresentou peso pré-gestacional inferior em comparação ao GDM (p=0,022) e GHAS (p=0,003). Apenas o GHAS apresentou peso pré-gestacional e ganho de peso gestacional superior ao GCON (p=0,002; p=0,018). Os valores de peso ao nascer do GRCIU foram inferiores em comparação aos demais grupos e o peso ao nascer do GDM foi superior ao GTAB (p<0,001). O comprimento ao nascer do GRCIU foi diferente de todos os outros (p<0,001), exceto o GHAS. A média do perímetro cefálico do GRCIU foi significativamente diferente dos demais grupos (p<0,001). Não houve diferença entre o consumo de macronutrientes e o perfil de AG entre as mães dos diferentes grupos. Todavia, o consumo do AG 20:4 n-6 foi maior no GHAS e a razão n-6/n-3 menor no GDM em relação ao GCON. Observou-se que não houve associação entre o consumo alimentar das gestantes e o peso ao nascer.

Resultados experimental: Ratos do GSM apresentaram consumo alimentar maior (p=0,047) e ganharam mais peso (p=0,012), porém, o conteúdo de neuropeptídeo Y não variou entre os grupos. Ratos do GSM também apresentaram maior deposição de gordura abdominal (p<0,001) e triglicérides plasmáticos (p=0,018), quando comparados ao GNM. Interação entre estresse neonatal e deficiência de AG

poliinsaturados ômega-3 foi encontrada com insulina plasmática ($p=0,033$), índice de HOMA ($p=0,049$), leptina ($p=0,01$) e expressão de PEPCK hepática ($p=0,05$), no qual a vulnerabilidade metabólica no GSM foi agravada com a dieta inadequada em AG poliinsaturados ômega-3. Houve associações entre alterações específicas no perfil de AG periféricos ($p<0,05$).

Conclusões: Assim, os achados clínicos sugerem que, a curto prazo, o consumo de AG das gestantes não influenciou o peso ao nascer dos RNs entre os diferentes ambientes intrauterinos, porém o GHAS possuiu maior consumo de AA e o GDM menor relação n-6/n-3. Os achados experimentais sugerem que as variações no ambiente neonatal interagem, a longo prazo, com a deficiência dietética de n-3 PUFAs, alterando a vulnerabilidade metabólica de ratos adultos.

Palavras-chaves: Pesquisa Translacional; Lipídios; Ácidos Graxos Ômega-3; Peso ao Nascer; Estresse Metabólico.

ABSTRACT

Introduction: In the last twenty years, clinical and experimental studies have shown that perinatal events (how early stress) associated with nutritional deficiency may influence in the individual health.

Clinical objective: To assess the impact of interaction between the food consumption with the infant intrauterine growth in the birth cohort.

Experimental objective: To assess whether an early stressful event such as maternal separation interacts with the nutritional availability of Omega-3 polyunsaturated fatty acids during the life course on metabolic aspects.

Clinical methods: This is a cohort involving the recruitment of births in hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Mothers from different clinical backgrounds (hypertensive-GHAS, diabetics-GDM, smokers-GTAB, having an intrauterine growth restriction for idiopathic reasons-GIUGR, and controls-GCON) were be invited twenty-four hours after the child birth. It was used data in postpartum interview (economic, social and anthropometric measures) and in home visit interview at 7 days of life (food frequency questionnaire). The cohort is ongoing and there are still the interviews: 15 days and 1, 3 and 6 month of life. The sample size consists in 20 mother-child pairs per group and 150 pairs in total.

Experimental methods: Litters rats were randomized into: maternal separated group (GMS) and non-handled group (GNH). The GMS was removed from their dam for 3 hours per day on days 1^o to 10^o postnatal (PND) and put in an incubator at 32°C. On PND 35, males were subdivided into two groups diets that were adequate or deficient in n-3 PUFAs, and this intervention was applied during the subsequent 15 weeks.

Animal's body weight and food consumption were measured weekly, and at the end of the treatment samples of tissues were collected.

Clinical results: From September 2011 to July 2013, 255 postpartum women were eligible, 218 (14.5%) agreed to participate and 182 (16.5%) had complete data for analysis. Comparing with the women eligible, refusals (n=37) have no significant differences between the variables, however, these mothers showed more average age (p=0.010) than lost. The GHAS had a mean age higher than the GTAB and GIUGR (p=0,007). The GRCIU presented prepregnancy weight lower compared to GDM (p=0,022) and GHAS (p=0.003). Only GHAS presented prepregnancy weigh and gestational weight gain above the GCON (p=0.002; p=0.018). The values of GRCIU birth weight were lower compared to the other groups and the birth weight of GDM was higher than GTAB (p<0.001). The birth length of GRCIU was different from all others (p<0.001), except in GHAS. The average of GIUGR head circumference was significantly different from the other groups (p<0.001). There was no statistically significant difference between macronutrient intake and fatty acid profile (AG) among mothers of different groups. However, consumption AG 20:4 n-6 was higher in GHAS and the ratio of n-6/n-3 is lower in GDM compared GCON. We observed no association between dietary intake of pregnant women and birth weight.

Experimental results: MS was associated with increased food intake (p=0.047) and weight gain (p=0.012), but no differences were found in the NPY hypothalamic content between the groups. MS rats had also increased deposition of abdominal fat (p<0.001) and plasma triglycerides (p=0.018) when compared to the GNH. Interactions between early life stress and n-3 PUFAs deficiency were found in plasma insulin (p=0.033), HOMA index (p=0.049), leptin (p=0.010) and liver PEPCK expression (p=0.05), in which the metabolic vulnerability in the GMS was aggravated by the n-3 PUFAs

deficient diet exposure. This was associated with specific alterations in the peripheral fatty acid profile ($p < 0.05$).

Conclusions: Thus, the clinical findings suggest that in the short term, AG consumption pregnant women did not influence intrauterine growth of children from different intrauterine environments, but the GHAS have more consumption of AA and GDM lower ratio n-6/n-3. Experimental findings suggest interacts variations in neonatal environment in the long term, with n-3 PUFAs deficient diet exposure, increasing the metabolic vulnerability in adult rats.

Key Words: Translational Medical Research; Lipids; Fatty Acids, Omega-3; Birth Weight; Stress, Physiological.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Parte Clínica:

Figura 1 - Fluxograma da coleta de dados.

Parte Experimental:

Figura 1 - Média \pm (SEM) do consumo alimentar semanal (por caixa) durante as 15 semanas de exposição crônica às dietas (desde DPN 35).

Figura 2 - Média \pm (SEM) do peso corporal semanal durante as 15 semanas de exposição crônica às dietas (desde DPN 35).

Figura 3 - Gordura abdominal [(soma dos depósitos renais e gonadais em grammas) * 100 / peso corporal total em grammas)].

LISTA DE TABELAS

Parte Clínica:

Tabela 1 - Características sociodemográficas e antropométricas da amostra, perdas e recusas.

Tabela 2 - Características sociodemográficas e antropométricas maternas e infantis entre os diferentes grupos.

Tabela 3 - Consumo alimentar diário retrospectivo da amostra geral e entre os diferentes grupos.

Tabela 4 - Peso ao nascer entre os diferentes grupos e a associação do consumo de AG PUFAs entre as gestantes.

Parte Experimental:

Tabela 1 - Composição da dieta.

Tabela 2 - Medições bioquímicas (média \pm SEM).

Tabela 3 - Composição dos ácidos graxos do sangue periférico do grupo separado e não-manipulado submetido à dieta adequada ou deficiente em n-3 PUFAs.

LISTA DE ABREVIATURAS ou SIGLAS

AA: Ácido araquidônico.

ABCD: *Amsterdam Born Children and their Development.*

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico.

AG: Ácido(s) graxo(s).

AGE: *Study of Asthma Genes and the Environment.*

AI: *Adequate Intakes.*

ALA: Ácido graxo alfa-linolênico.

ALSPAC: *Avon Longitudinal Study of Parents and Children.*

ANOVA: Análise de variância.

BRISA: Coorte de Nascimento Brasileira de Ribeirão Preto e São Luís.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar.

COX: Cicloxigenases.

CPC: Centro de Pesquisa Clínica.

CPY: Citocromo P450 monoxigenases.

DHA: Ácido graxo docosaenoico.

DM: Diabetes melitus.

DOHaD: Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença.

DP: Desvio padrão.

DPN: Dia pós-natal.

DRIs: *Dietary Reference Intakes.*

ENRIECO: *Environmental Health Risks in European Birth Cohorts.*

EPA: Ácido graxo eicosapentaenoico.

EETs: Ácido(s) epoxieicosatrienoico(s).

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

GCON: Grupo Controle.

GDM: Grupo com Diabetes.

GHAS: Grupo com Hipertensão.

GHC: Grupo Hospitalar Conceição.

GLM: Regressão linear múltipla.

GNM: Grupo Não-Manipulado.

GRCIU: Grupo de Recém-nascidos com RCIU idiopático.

GSM: Grupo Separação Materna.

GTAB: Grupo de Tabagistas.

HAS: Hipertensão arterial sistólica.

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

HDL: Lipoproteína de alta densidade.

HETEs: Ácido(s) hidroxieicosatetraenoico(s).

HOMA: Modelo de Avaliação da Homeostase.

HPA: Hipotálamo-Pituitária-Adrenal.

ICLAS: Conselho Internacional de Ciência em Animal de Laboratório.

IOM: *Institute of Medicine*.

IMC: Índice de Massa Corporal.

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

LA: Ácido graxo linoleico.

LDL: Lipoproteína de baixa densidade.

LOX: Lipoxigenases.

LSD: *Fisher's Least Significant Difference*.

MAVAN: *Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment.*

NPY: Neuropeptídeo Y.

n-3 PUFAs: Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série ômega-3.

n-6 PUFAs: Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série ômega-6.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

PN: Peso ao nascer.

POF: Pesquisa de Orçamento Familiar.

PUFAs: Ácidos graxos poliinsaturados.

QFA: Questionário de frequência alimentar.

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa.

RCIU: Restrição de crescimento intrauterino.

RNA: Ácido ribonucleico.

RS: Rio Grande do Sul.

RN(s): Recém-nascido(s).

RNBP: Recém-nascido(s) com baixo peso ao nascer.

RQ: *Relative quantification.*

SEM: Erro padrão da média.

SM: Síndrome metabólica.

TAB: Tabagistas.

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido.

TG: Triglicerídeos.

UBS: Unidade Básica de Saúde.

UEA: Unidade de Experimentação Animal.

VIVA: *Study of Health for The Next Generation.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHaD)...	24
2.1.1 Conceitos.....	24
2.1.2 Relação do DOHaD com a Nutrição.....	25
2.2 ÁCIDOS GRAXOS.....	27
2.2.1 Conceitos.....	27
2.2.2 Efeitos do Consumo de Ácidos Graxos.....	30
2.3 ESTRESSE MATERNO.....	33
2.3.1 Ambientes Intrauterinos Adversos - Parte Clínica.....	33
2.3.2 Separação Materna - Parte Experimental.....	36
2.4 INTERAÇÃO ÁCIDOS GRAXOS E ESTRESSE MATERNO.....	37
2.4.1 Crescimento Intrauterino X Estresse - Parte Clínica.....	37
2.4.2 Aspectos Metabólicos X Estresse - Parte Experimental.....	39
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1 OBJETIVOS CLÍNICOS.....	41
4.2 OBJETIVO EXPERIMENTAL.....	41
5. HIPÓTESES DE TRABALHO.....	42
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
6.1 PARTE CLÍNICA.....	43
6.1.1 Delineamento.....	43
6.1.2 Amostra.....	43

6.1.3 Logística do Estudo.....	44
6.1.4 Variáveis Estudadas.....	45
6.1.5 Cálculo Amostral.....	49
6.1.6 Qualidade dos Dados.....	49
6.1.7 Análises Estatísticas.....	50
6.1.8 Aspectos Éticos.....	51
6.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	52
6.2.1 Delineamento.....	52
6.2.2 Amostra.....	52
6.2.3 Modelo de Estresse Neonatal.....	53
6.2.4 Grupos Dietéticos e Composição das Rações.....	54
6.2.5 Dissecção de Gordura Abdominal e Coleta de Tecidos.....	56
6.2.6 Determinação da Composição de Ácidos Graxos da Dieta e do Sangue Periférico.....	56
6.2.7 Análises Bioquímicas.....	57
6.2.8 qPCR (Reação em cadeia da polimerase quantitativa) em Tempo Real.....	58
6.2.9 Cálculo Amostral.....	59
6.2.10 Análises Estatísticas.....	59
6.2.11 Aspectos Éticos.....	60
7. RESULTADOS.....	61
7.1 PARTE CLÍNICA.....	61
7.1.1 Características Gerais.....	61
7.1.2 Características do Consumo Alimentar das Gestantes.....	65
7.1.3 Peso ao Nascer.....	67
7.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	69

7.2.1 Ganho de Peso e Consumo Alimentar.....	69
7.2.2 Gordura Abdominal.....	71
7.2.3 Análises Bioquímicas.....	72
7.2.4. Determinação dos Ácidos Graxos no Sangue Periférico.....	74
8. DISCUSSÃO.....	78
8.1 PARTE CLÍNICA.....	78
8.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	85
9. CONCLUSÕES.....	92
10. ANEXOS.....	93
10.1 ANEXO I - ARTIGO PUBLICADO.....	93
10.2 ANEXO II - ARTIGO PUBLICADO.....	105
10.3 ANEXO III - ARTIGO PUBLICADO.....	117
11. APÊNDICES.....	126
11.1 APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..	126
11.2 APÊNDICE II - QUESTIONÁRIO DADOS GERAIS.....	128
11.3 APÊNDICE III - QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR.....	137

1. INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas têm demonstrado que eventos perinatais podem ter impacto na saúde do indivíduo, programando doenças como a obesidade, dislipidemia, diabetes e hipertensão, entre outras (Barker *et al.*, 2002; Gluckman & Hanson, 2004b; Gluckman & Hanson, 2008). Assim, com a ideia original desenvolvida por Barker *et al.*, (Barker *et al.*, 2002) surge a linha de pesquisa DOHaD: “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença” (*Developmental Origins of Health and Disease*) com a afirmativa de que agravos sofridos em fases precoces podem afetar o indivíduo de maneira persistente ao longo da vida. Este ramo do conhecimento aborda conceitos envolvidos na consolidação da pesquisa translacional utilizando para isso estudos clínicos, experimentais e genéticos (Silveira *et al.*, 2007). Dessa forma, este trabalho pretendeu responder as hipóteses formuladas por meio de um estudo clínico prospectivo e um experimental, envolvendo aspectos de estresse e deficiência nutricional.

Sabe-se que os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos (AG), desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos (Connor, 2000). Em relação às suas subdivisões, os AG podem ser classificados conforme o tamanho de suas cadeias carbônicas (curta, média ou longa) ou ainda quanto à localização da primeira insaturação a partir do terminal metil: saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados (Youdim *et al.*, 2000).

Especial atenção tem se evidenciado na literatura sobre a função dos AG poliinsaturados (famílias de AG da série ômega-3 e ômega-6) na saúde fetal, pois alguns dos seus constituintes desempenham importantes funções para o adequado neurodesenvolvimento, nutrição e crescimento infantil (Connor, 2000; Rombaldi Bernardi *et al.*, 2012).

Aliado às consequências das deficiências nutricionais, outro fator estudado e explorado neste trabalho foi o estresse materno e suas interações influenciando as consequências a curto (estudo clínico) e a longo prazo (estudo experimental) nas populações distintas.

Sobre os estudos clínicos prospectivos, poucas coortes de nascimentos foram desenhadas após o estabelecimento do conceito do DOHaD (Shea *et al.*, 2007; Rifas-Shiman *et al.*, 2009; Cardoso & Brisa, 2010; Jaddoe *et al.*, 2010; van Eijsden *et al.*, 2011; Vrijheid *et al.*, 2012). Entretanto, muitos estudos têm demonstrado que o fenótipo materno no qual o feto é desenvolvido, influenciado por fatores como: comportamento, metabolismo, utilização de drogas e doenças da mãe, é influente em determinar os padrões de saúde infantil (Glatt *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2005; Farkas *et al.*, 2006; Desai *et al.*, 2007; Dode & González, 2010; Maniam & Morris, 2010; Ayres *et al.*, 2011; Purcell *et al.*, 2011; Bernardi *et al.*, 2012).

Na parte experimental, o modelo “separação maternal” tem sido utilizado para avaliar as consequências biológicas ao longo da vida (Clarke *et al.*, 2009). Evidenciam-se, nos animais submetidos ao modelo, alterações crônicas na interação mãe-filhote, as quais podem influenciar o desenvolvimento do filhote e mediar mudanças a longo prazo nos adultos (Plotsky & Meaney, 1993). Portanto, o estresse ou a exposição ao excesso de glicocorticoides em fases sensíveis ao desenvolvimento, como os períodos fetais ou neonatais, constituem-se importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas como a obesidade, diabetes melitus (DM) tipo 2 e doenças cardiovasculares ao longo da vida (Vanitallie, 2002; Gluckman & Hanson, 2004b; Seckl, 2004).

Dessa forma, considerando os efeitos da separação materna, este modelo experimental torna-se interessante para avaliar o estresse ambiental precoce e propiciar a investigação dos efeitos a longo prazo de intervenções neonatais.

Portanto, este trabalho, com intuito de explorar o tema nos aspectos clínicos e experimentais foi subdividido nas seções: material e métodos, resultados (tabelas e figuras) e discussão. Assim, o objetivo da parte clínica consistiu-se em determinar o impacto da interação entre o consumo alimentar das gestantes com o crescimento intrauterino em uma coorte de nascimentos (“Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Recém-Nascido nos Primeiros Seis Meses de Vida” - IVAPSA) de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Por outro lado, o objetivo da parte experimental constituiu-se em determinar se o estresse neonatal, como a separação materna, interage com a deficiência nutricional de AG poliinsaturados ômega-3 (n-3 PUFAs) ao longo da vida em aspectos metabólicos em ratos machos adultos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHaD)

2.1.1 Conceitos

Nos últimos vinte anos, vários estudos têm demonstrado que eventos perinatais podem impactar na saúde dos indivíduos, tornando-os biologicamente diferentes, de forma persistente, até a vida adulta (Barker *et al.*, 1989; Barker *et al.*, 2002; Gluckman & Hanson, 2007). A partir dessa premissa, houve a geração de alguns conceitos importantes como a “Hipótese do Fenótipo Poupador” (*Thrifty Phenotype Hypothesis*), a qual propõe que o feto seja capaz de se adaptar a um ambiente intrauterino adverso otimizando o uso de suprimentos energéticos reduzidos, para garantir sua sobrevivência (Hales & Barker, 1992) e como a “Programação” (*Programming*), a qual propõe que um insulto aplicado em um período crítico possa ter efeitos duradouros ou persistentes sobre a estrutura ou função do organismo (Lucas, 1991).

A partir dos resultados encontrados nos estudos e dos conceitos estabelecidos, formulou-se a linha de pesquisa denominada “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença” - DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*) (Gluckman & Hanson, 2004a), a qual agrega informações de diferentes áreas do conhecimento e está envolvida na consolidação da pesquisa translacional utilizando para isso estudos clínicos, experimentais e genéticos (Silveira *et al.*, 2007). Assim, com a ideia original desenvolvida por Barker *et al.*, (Barker *et al.*, 2002) surge o conceito do DOHaD com a afirmativa de que agravos sofridos em fases iniciais podem afetar o indivíduo de maneira persistente ao longo da vida.

Outro importante conceito desenvolvido foi o “exposoma” (Wild, 2005), o qual o autor defende a necessidade de mais pesquisas para determinar as exposições que complementam o genoma na definição de riscos para a saúde. O termo “exposoma” abrangeria as exposições ambientais ao longo da vida, iniciando no período pré-natal.

Assim, ressalta-se a importância de estudos longitudinais que analisem o impacto de exposições e seus efeitos ao longo da vida, assim como pesquisas experimentais para determinar os mecanismos envolvidos nestes processos.

2.1.2 Relação do DOHaD com a Nutrição

Existem evidências clínicas e experimentais de que a nutrição insuficiente ou inadequada materna e/ou infantil em períodos vulneráveis pode alterar aspectos do indivíduo ao longo da vida, influenciando a predisposição a doenças crônicas associadas à alimentação, incluindo a obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares (Vanitallie, 2002; Martin *et al.*, 2003; Gluckman & Hanson, 2004b).

Dentre os mecanismos envolvidos nestes processos, estudo de revisão realizado por Mathers sugere que a nutrição precoce possa alterar a estrutura da cromatina e a expressão gênica, modulando a saúde ao longo da vida (Mathers, 2007).

Em relação à nutrição insuficiente, evidencia-se que crianças expostas à desnutrição na vida precoce podem apresentar efeitos duradouros sobre a estrutura do cérebro e persistentes interrupções sobre os sistemas de resposta a estresse (Jones *et al.*, 2006; de Bie *et al.*, 2010). Outro estudo realizado com ovelhas grávidas submetidas à desnutrição grave mostrou alteração no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) nos adultos da prole. Os animais expostos à desnutrição na gestação por 10 dias demonstraram alterações nos níveis de esteroides, incluindo aumento da resposta do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em comparação aos animais do grupo controle

ou aos filhotes expostos à desnutrição na gestação no período de 20 dias (Bloomfield *et al.*, 2003).

Da mesma forma, a nutrição em excesso na vida precoce também se encontra associada a efeitos ao longo da vida. Estudo baseado no modelo de desnutrição fetal durante a gestação seguida de dieta hipercalórica após o parto demonstrou que a hiperfagia na vida adulta resulta da consequência da programação fetal com mudanças permanentes nos níveis plasmáticos de insulina, leptina e peso corporal em ratos adultos (Vickers *et al.*, 2000). Outro estudo experimental demonstrou que dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação afetou a susceptibilidade da prole à obesidade induzida pelo consumo da dieta (Tamashiro *et al.*, 2009).

Assim, especificamente sobre os lipídios, diversos estudos pesquisam a influência do consumo de alguns AG na saúde materna e fetal. Estudo experimental realizado com ratos expostos ao consumo elevado de AG saturado durante a gestação e a lactação resultou em obesidade, hiperglicemia, resistência insulínica e hipertensão na vida adulta, em relação ao grupo controle (Liang *et al.*, 2009). Outro estudo experimental, com modelo para o desenvolvimento dietético de diabetes gestacional, encontrou que o maior consumo de AG saturado antes da gestação pode resultar em resistência insulínica e danos vasculares na placenta (Liang *et al.*, 2010). Sobre o consumo de AG PUFAs, estudo experimental com o objetivo de avaliar os efeitos do consumo da semente de linhaça durante a lactação, encontrou que o consumo materno da ração promoveu menor peso ao desmame e níveis menores de hemoglobina na idade adulta quando comparados aos controles. Entretanto, não foram verificadas diferenças estatísticas na massa de gordura visceral entre os grupos (Cardozo *et al.*, 2010).

Poucos estudos têm explorado as alterações da deficiência precoce de micronutrientes no desenvolvimento de desordens metabólicas na vida adulta e os

resultados demonstrados são conflitantes. Estudo realizado no Nepal mostrou que a suplementação diária de polivitamínicos em gestantes resultou em pequena diminuição na pressão arterial nas crianças aos 2,5 anos de idade (Vaidya *et al.*, 2008), enquanto que não houve efeito na pressão arterial entre 6 a 8 anos de vida das crianças (Stewart *et al.*, 2009). Estudo feito na Índia demonstrou que altas concentrações de folato eritrocitário materno estiveram associadas a maior adiposidade e resistência insulínica em crianças com 6 anos de idade (Yajnik *et al.*, 2008). Por outro lado, estudo realizado na Inglaterra encontrou que o consumo de folato materno entre 18 a 32 semanas gestacionais não esteve associado a medidas de composição corporal nas crianças com 9 anos de idade (Lewis *et al.*, 2009).

2.2. ÁCIDOS GRAXOS

2.2.1 Conceitos

Sabe-se que os ácidos graxos (AG) constituem-se componentes estruturais das membranas celulares, cumprindo funções energéticas e de reservas metabólicas, além da formação de alguns hormônios e sais biliares (Connor, 2000; Valenzuela & Nieto, 2003), assim, a adequação dietética no consumo de lipídios torna-se importante para o funcionamento adequado do organismo.

Em relação às suas classificações, os AG podem ser subdivididos conforme o tamanho da cadeia carbônica (curta, média ou longa) ou ainda quanto à localização da primeira insaturação a partir do terminal metil (saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados) (Youdim *et al.*, 2000). Dentro da diversidade dos AG, existem aqueles que o organismo tem capacidade de síntese, porém, outros não podem ser sintetizados

endogenamente e devem estar presentes na alimentação para que possam ser utilizados pelos tecidos corporais.

Os AG saturados compreendem aqueles constituídos sem duplas ligações entre seus átomos de carbonos, como exemplos dos mais frequentes: láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0), os quais variam de 12 a 18 átomos de carbono em sua estrutura. Entre os AG monoinsaturados, o mais frequente é o ácido oleico (18:1 n-9) que contém 18 átomos de carbono (Sposito *et al.*, 2007). Em relação aos AG da série ômega-3 (PUFAS n-3) eles são compreendidos pelo: ácido alfa-linolênico (ALA; 18:3 n-3), ácido docosaexaenoico (DHA; 22:6 n-3) e ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) e os da série ômega-6 (PUFAs n-6) pelo ácido linoleico (LA; 18:2 n-6) e ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6). Os AG poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs) da série ômega-3 (18:3 n-3) e ômega-6 (18:2 n-6), representados pelo AG linolênico e linoleico (Trumbo *et al.*, 2002), são considerados essenciais, pois sua biossíntese é inadequada no organismo. Assim, sabe-se que os AG com cadeia dupla nas posições 3 e 6 não podem ser sintetizados endogenamente pela espécie humana e, portanto, devem ser providos pela dieta. Ambos AG, n-6 e n-3, são metabolizados pela mesma série de enzimas dessaturases e elongases de cadeia longa (Heird & Lapillonne, 2005), por isso a importância da adequada razão entre eles.

Em relação às fontes alimentares dos AG, os saturados estão naturalmente presentes na dieta na forma de gordura animal (carnes gordurosas, leite e derivados), de polpa e leite de coco e de alguns óleos vegetais, como os de dendê. Já os AG monoinsaturados estão presentes no óleo de oliva, de canola, azeitona, abacate e oleaginosas (amendoim, castanhas, nozes, amêndoas) (Sposito *et al.*, 2007). Os AG ALA e LA estão presentes tanto em espécies vegetais como animais empregados na alimentação humana. As principais fontes de ALA constituem-se de óleos vegetais,

especialmente os de linhaça, de soja e de canola, já os AG da família EPA e DHA são encontrados em peixes de águas muito frias e profundas, como salmão, sardinha, atum e cavalinha (Marszalek & Lodish, 2005; Martin *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2013). Isso ocorre, devido à expressiva quantidade desses AG no fitoplâncton, que provê a sua distribuição ao longo da cadeia alimentar marinha (Martin *et al.*, 2006). Além disso, o consumo de suplementos a base de óleo de peixe tem sido utilizado pela população por apresentarem geralmente baixo conteúdo de contaminantes (metilmercúrio) e por fornecerem substancialmente altas doses de n-3 PUFAs (Oken & Belfort, 2010). As fontes alimentares de LA constituem-se de óleos vegetais de soja, milho e girassol e carnes, principalmente o frango (Marszalek & Lodish, 2005; Martin *et al.*, 2006; Sposito *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013).

Revisão contendo estudos de 13 países analisando o produto interno bruto encontrou forte associação positiva entre a situação econômica do país e o fornecimento de n-3 PUFAs. Nas famílias que viviam principalmente a base alimentar de plantas, a maior parte do consumo de PUFAs era proveniente de óleos vegetais e cereais (Michaelsen *et al.*, 2011).

O *Institute of Medicine* (IOM) indica, por meio das recomendações de ingestão diária de nutrientes (DRIs - *Dietary Reference Intakes*), que o consumo de lipídios varie em relação às calorias totais: 20 a 35% para gestantes e adultos, 25 a 35% para crianças e adolescentes entre 4 a 18 anos e 30 a 40% de crianças entre 1 a 3 anos. Aproximadamente 10% do valor calórico de lipídios deve provir do consumo de n-3 e n-6 PUFAs. Dessa forma, a recomendação de n-3 e n-6 varia entre 0,6% a 1,2% e 5% a 10% do valor calórico dos lipídios, respectivamente. A recomendação de ALA e LA constituem-se por gramas diárias e varia conforme o grupo etário e o gênero, sendo classificada como uma Ingestão Adequada (AI - *Adequate Intakes*). Os valores de AG

saturados e *trans* não estão determinados pelas DRIs, apenas há a recomendação de que o consumo seja o mais baixo possível, aliado a uma dieta nutricionalmente adequada (Trumbo *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a recomendação de lipídios para as gestantes, em relação às calorias totais, encontra-se entre 15 a 30%, sendo <10% de AG saturados, entre 7 a 10% de AG PUFAs e entre 10 a 15% de AG monoinsaturados (Holt, 2003). Em relação ao consumo de DHA, sua recomendação diária durante a gestação varia entre 200 a 300mg (Jordan, 2010). Nos primeiros 6 meses de vida dos lactentes a termo e pré-termos, o consumo dietético de n-3 PUFAS deve corresponder entre 0,45 a 1,5% do valor calórico dos lipídios com a razão n-3 e n-6 de 1:4 a 1:10 (Guesnet & Alessandri, 2011).

Sobre as recomendações dietéticas para reduzir o risco de doenças cardiovasculares, evidência suporta valores de 500mg/dia de EPA e DHA. Para o tratamento da doença, 1g/dia seria o recomendado (Gebauer *et al.*, 2006). A V Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose recomenda para o tratamento da hipercolesterolemia em relação às calorias totais, 25 a 35% de lipídios, sendo $\leq 7\%$ AG saturados, $\leq 20\%$ AG monoinsaturados e $\leq 10\%$ de AG PUFAs (Sposito *et al.*, 2007).

2.2.2 Efeitos do Consumo de Ácidos Graxos

Sabe-se que a quantidade e a qualidade do AG consumida exerce influência direta sobre a concentração de lipídios e de lipoproteínas plasmáticas, resistência insulínica e risco cardiovascular (Haag & Dippenaar, 2005). Isto pode ocorrer em função do AG presente na gordura, o qual é capaz de modular, diferentemente, diversos mecanismos regulatórios em nível celular (Manco *et al.*, 2004).

Os AG saturados são considerados consensualmente aterogênicos (Warensjo *et al.*, 2005). Estudo experimental realizado com camundongos submetidos à dieta enriquecida com AG saturados encontrou que os mesmos são capazes de aumentar a captação do LDL colesterol (lipoproteína de baixa densidade) na parede dos vasos. Além disso, houve aumento da atividade da lipoproteína lipase na parede das artérias (Seo *et al.*, 2005).

Estudo realizado com 50 ratos recebendo diferentes dietas não demonstrou diferença estatisticamente significativa no ganho de peso, consumo alimentar e consequentemente no coeficiente de eficiência alimentar entre os animais. Entretanto, o tipo de fonte lipídica utilizada promoveu alterações nas concentrações séricas de colesterol total, HDL colesterol (lipoproteína de alta densidade), triglicerídeos (TG) e albumina, sendo considerado como melhor valor aquele apresentado pelo grupo que recebeu dieta contendo soja, em comparação a gordura de peixe, gordura de coco, manteiga e margarina (Almeida *et al.*, 2011).

Por outro lado, estudos controlados clínicos e epidemiológicos sugerem efeito benéfico do consumo de n-3 PUFAs, de origem animal ou vegetal, em doenças cardiovasculares (Gebauer *et al.*, 2006) e a participação de seus componentes como precursores ativos de constituintes biológicos (prostaglandinas e leucotrienos) (Bourre, 2004). Entretanto, mais estudos ainda são necessários para elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos metabólicos e cardiovasculares dos efeitos de n-3 PUFAs (Raposo, 2010). Evidências sugerem que a alimentação contendo baixo conteúdo de PUFAs pode estar envolvida em uma série de doenças, como o desenvolvimento de síndrome metabólica (SM) (Agostoni, 2010) em conjunto com alterações na resposta ao estresse (Reynolds, 2013), padrões de comportamentos (Reynolds, 2013) e traços de personalidade (Sutin *et al.*, 2010), estimulando a atividade do Sistema Nervoso

Simpático (Straznicky *et al.*, 2008) e aumentando a secreção de catecolaminas (De Pergola *et al.*, 2008), cortisol e serotonina (Singh *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007).

Evidencia-se que os AG da série DHA (n-3) e AA (n-6) são essenciais para o desenvolvimento cerebral e cognitivo e também se acumulam rapidamente no cérebro e retina durante os últimos estágios da gestação e vida pós-natal precoce (Martinez, 1992). Assim, como durante a gestação os AG DHA e AA são transportados via placentária (ativa ou passivamente) para o sangue venoso fetal (Campbell *et al.*, 1997; Dutta-Roy, 2000), a nutrição na gestação tem influência importante para o desenvolvimento fetal. Após o nascimento, o leite materno constitui-se fonte principal de DHA e AA para o lactente. Sabe-se que o conteúdo de PUFAs no leite materno é dependente do consumo materno de AG (Harris *et al.*, 1984; Helland *et al.*, 1998) e que o conteúdo de PUFAs pode ser menor em populações que consomem dietas a base de plantas ou consumo limitado de peixes (Michaelsen *et al.*, 2011).

Revisão contendo estudos com humanos e artigos em inglês entre 2000-2010 sugere que o n-3 (em particular o DHA) durante a gestação, lactação e vida precoce pode estar associado com benefícios no crescimento e no desenvolvimento infantil em populações de países em desenvolvimento. Estudos nestes países mostraram que o elevado consumo de n-3 ou a suplementação durante a gestação podem resultar em pequenas melhorias no peso e comprimento ao nascer e idade gestacional, com base em dois estudos randomizados controlados e um estudo transversal. Dados sugerem que a suplementação de ALA ou DHA durante a lactação e na infância pode ser benéfica para o crescimento e desenvolvimento de crianças entre 6-24 meses, porém, o efeito é mais pronunciado em crianças desnutridas. Não há evidência da melhoria no crescimento em crianças com idade superior a 2 anos (Huffman *et al.*, 2011). Outra revisão realizada com o objetivo de avaliar a efetividade e a segurança da suplementação de PUFAs em

mães que amamentam em relação ao desenvolvimento cognitivo e físico de seus filhos incluiu seis ensaios clínicos randomizados envolvendo 1280 mulheres. A suplementação de PUFAs pareceu não melhorar o neurodesenvolvimento infantil e a acuidade visual. Houve dois estudos em que a suplementação de PUFAs esteve associada com aumento da circunferência cefálica (Delgado-Noguera *et al.*, 2010). Portanto, sugere-se que ensaios clínicos controlados em larga escala devam ser realizados para confirmar a eficácia dos AG PUFAs e estabelecer a dose mínima e a duração da suplementação a fim de padronizar os resultados clínicos encontrados.

Estudo com o objetivo de determinar a associação entre o consumo de frutos do mar em mulheres e o crescimento fetal não encontrou diferença estatisticamente entre eles. Entretanto, nas mulheres com sobrepeso, o maior consumo de frutos do mar antes da gestação esteve associado a maior circunferência biparietal fetal e circunferência abdominal e medidas antropométricas infantis. Do menor para o maior tercil de consumo, a média do peso ao nascer (PN) foi 167g maior. Não houve associações significativas entre o consumo final da gestação e as medidas (Drouillet *et al.*, 2009).

Assim, associando a importância do consumo adequado dos PUFAs na gestação, lactação e infância com os impactos a médio e a curto prazo das deficiências nutricionais, surgiu uma das premissas deste trabalho.

2.3 ESTRESSE MATERNO

2.3.1. Ambientes Intrauterinos Adversos - Parte Clínica

Diversos estudos têm demonstrado que o fenótipo materno no qual o feto é desenvolvido, influenciado por fatores como: comportamento, metabolismo, utilização de drogas e doenças da mãe, é influente em determinar os padrões de saúde infantil

(Glatt *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2005; Farkas *et al.*, 2006; Desai *et al.*, 2007; Dode & González, 2010; Maniam & Morris, 2010; Ayres *et al.*, 2011; Purcell *et al.*, 2011; Bernardi *et al.*, 2012).

Alguns estudos longitudinais, iniciados após o conceito do DOHaD, possuem o objetivo de estudar os ambientes intrauterinos adversos na gestação e lactação e as consequências no recém-nascido (RN). Por exemplo, coorte canadense denominada MAVAN (*Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment*) publicou em 2007 os resultados preliminares com subamostra referente aos efeitos da depressão materna e da ansiedade sobre a resposta do cortisol durante a gravidez (Shea *et al.*, 2007). Já em 2012 houve resultados referentes às crianças, focando nas consequências a curto prazo na preferência alimentar no ambiente de Restrição de Crescimento Intrauterino (RCIU) (Silveira *et al.*, 2012). O projeto americano VIVA (*Study of Health for The Next Generation*) publicou resultados referentes às relações das características maternas e de qualidade da dieta e suas associações durante o primeiro trimestre gestacional (Rifas-Shiman *et al.*, 2009) e artigos de avaliação retrospectiva, como por exemplo, a associação entre o tipo de leite consumido pela criança (Huh *et al.*, 2010) e o cuidado materno (Benjamin *et al.*, 2009) sobre adiposidade infantil aos 3 anos de idade. A coorte denominada *Generation R Study* na Holanda tem publicações de seus protocolos de pesquisas conforme o seguimento das crianças, desde 2006 até 2012 (Jaddoe *et al.*, 2006; Jaddoe *et al.*, 2008; Jaddoe *et al.*, 2010; Jaddoe *et al.*, 2012) e a partir de então publica resultados a respeito, como por exemplo, a associação de variáveis ao nascimento e composição corporal em crianças pré-escolares (Taal *et al.*, 2012). A coorte denominada ABCD (*Amsterdam Born Children and their Development*) delimita como principais fatores de risco maternos e ambientais: aspectos nutricionais, metabólicos, psicossociais, de estresse, abuso de substâncias, condições de saúde e

poluição ambiental interagindo com desfechos ao nascimento e crescimento infantil (van Eijsden *et al.*, 2011). Já a coorte europeia ENRIECO (*Environmental Health Risks in European Birth Cohorts*) tem o objetivo de avançar o conhecimento sobre as relações causais específicas entre os contaminantes ambientais e de saúde da criança (Vrijheid *et al.*, 2012).

Em relação às coortes brasileiras, com avaliações sobre a linha de pesquisa DOHaD, há as coortes de nascimento de Ribeirão Preto, São Paulo (1978/79, 1994) e em conjunto com São Luís, Maranhão (1997/98) (Cardoso *et al.*, 2007) e mais recentemente a BRISA (Coorte de Nascimento Brasileira de Ribeirão Preto e São Luís) (Cardoso & Brisa, 2010). Em Pelotas, as coortes de nascimentos constituídas pelos nascidos vivos de mães residentes na área urbana do município nos anos de 1982, 1993 e 2004 têm o objetivo de avaliar as mudanças nas condições de parto, crescimento, desenvolvimento e morbi-mortalidade infantil, assim como a influência de fatores pré e perinatais sobre a morbidade dos participantes na idade adulta (Barros *et al.*, 2008a; Barros *et al.*, 2008b). Além disso, a coorte denominada IVAPSA de Porto Alegre, RS publicou seu protocolo de pesquisa em 2012 (Bernardi *et al.*, 2012) com o objetivo de avaliar os diferentes ambientes maternos (diabetes, hipertensão, tabagismo, restrição de crescimento intrauterino idiopático e controles) em relação a aspectos da criança até 6 meses de idade, como, os nutricionais, comportamentais, moleculares e sobre neurodesenvolvimento.

Em relação aos desfechos baixo peso ao nascer (BPN) e/ou prematuridade, evidencia-se que o tabagismo, a hipertensão/pré-eclâmpsia, inflamações/infecções, obesidade e desnutrição constituem-se as causas mais comuns para sua ocorrência, por serem fatores conhecidos de estresse oxidativo (Brenseke *et al.*, 2013).

Pesquisadores demonstraram que o BPN está associado a um padrão alterado de lipídios plasmáticos (Davies *et al.*, 2004), densidade mineral óssea reduzida (Szathmari *et al.*, 2000), respostas diferenciadas para o estresse (Jones *et al.*, 2006), artérias menos elásticas (Painter *et al.*, 2007), padrões específicos de secreção hormonal (Jones *et al.*, 2007) e maior incidência de depressão (Thompson *et al.*, 2001; Rice *et al.*, 2006) nos indivíduos.

Revisão sistemática com o objetivo de mostrar os pontos concordantes e contraditórios sobre a associação entre o PN e o excesso de peso em crianças com até sete anos de idade demonstrou que apesar da heterogeneidade dos artigos selecionados, foi possível identificar associação predominantemente positiva entre o PN e obesidade na infância. Por outro lado, a inconsistência de alguns aspectos relacionados ao PN e à obesidade infantil sugere abordagem que incorpore o efeito do contexto no quadro de componentes associados à obesidade infantil (Martins & Carvalho, 2006). Outra revisão sistemática com o objetivo de identificar estudos que avaliaram a associação entre determinantes nutricionais precoces e a massa livre de gordura no início da vida adulta evidenciou que as variáveis peso e comprimento ao nascer, assim como suas variações ao longo da infância, são fortes preditores da massa livre de gordura em idades posteriores. Houve evidências de que quanto maior o PN e o ganho de peso nos primeiros anos de vida, tanto maior será a massa livre de gordura na vida adulta (Orlandi *et al.*, 2013).

2.3.2. Separação Materna - Parte Experimental

A separação materna é um modelo experimental bem conhecido (separação mãe-filhotes por longos períodos no período neonatal) para examinar as consequências biológicas ao longo da vida (Clarke *et al.*, 2009). As respostas fisiológicas agudas da

separação materna estão evidenciadas, como o aumento dos níveis de corticosteroides (Kuhn *et al.*, 1978; Jahng, 2011), entretanto, este modelo tem sido associado com alterações crônicas na interação mãe-filhote, as quais podem influenciar o desenvolvimento precoce e mediar mudanças a longo prazo nos adultos (Plotsky & Meaney, 1993). Sobre as consequências relatadas, estudo realizado com ratos adultos separados mostrou que os mesmos exibiram alta capacidade de resposta ao estresse, demonstrando níveis mais elevados de glicocorticoides após estresse agudo e alterações na regulação emocional e comportamental quando submetidos a ambientes experimentais específicos (Plotsky & Meaney, 1993). Além disso, os animais separados mostraram ser mais vulneráveis a desenvolver perfil comportamental comparável à depressão (Lee *et al.*, 2007a; George *et al.*, 2010; Jahng, 2011) e comportamentos de ansiedade na vida adulta (Jahng, 2011).

Portanto, considerando os efeitos da separação materna nos filhotes, este modelo constitui-se interessante para avaliar o estresse ambiental precoce e propiciar a investigação dos efeitos a longo prazo de intervenções neonatais.

2.4 INTERAÇÃO ENTRE ÁCIDOS GRAXOS E ESTRESSE MATERNO

2.4.1 Crescimento Intrauterino X Estresse - Parte Clínica

Poucos estudos clínicos tem relacionado a inadequação nutricional materna aliada a estresse precoce em desfechos a curto ou a longo prazo na criança.

Resultados da coorte canadense AGE (*Study of Asthma Genes and the Environment*) demonstraram que o risco de excesso de peso na idade de 9-11 anos é elevada entre crianças cujas mães tinham experimentado depressão no período pós-parto (Kozyrskyj *et al.*, 2011).

O ambiente de restrição de crescimento intrauterino (RCIU), como estressor, tem sido estudado em relação às preferências alimentares infantis a curto e a longo prazo. Estudo realizado com bebês de um dia de idade encontrou correlação do crescimento intrauterino com a resposta hedônica ao doce (Ayres *et al.*, 2012). Meninas restritas com 3 anos de idade mostraram ser mais impulsivas do que o esperado para pegar um alimento doce, em relação ao comportamento das crianças não restritas (Silveira *et al.*, 2012). Mulheres nascidas com RCIU apresentaram aos 24 anos de idade maior preferência por carboidratos em relação às proteínas, além de apresentarem a relação cintura-quadril maior em comparação àquelas que nasceram com peso adequado para a idade gestacional (Barbieri *et al.*, 2009). Mulheres expostas à fome holandesa (1944-1945) no início da gestação (desnutrição intrauterina) aos 58 anos de idade preferiram consumir dietas com maior conteúdo de lipídio, apresentaram perfil lipídico aterogênico (Lussana *et al.*, 2008) e tiveram maior consumo calórico, devido à maior percentagem de lipídios na dieta habitual, em comparação as mulheres não expostas (Stein *et al.*, 2009).

Outro ambiente estressor estudado em relação às modificações alimentares é o do tabagismo. Estudo encontrou que indivíduos expostos ao tabagismo durante a gestação consumiram mais carboidrato em relação à proteína, comparado aos não expostos. Ressalta-se que os resultados tiveram ajustes para PN, Índice de Massa Corporal (IMC), gênero, atividade física, fumo atual e escolaridade materna (Ayres *et al.*, 2011). Sobre os demais ambientes estudados neste estudo, diabetes e hipertensão, não foram encontrados estudos que tenham relacionado à exposição ao ambiente intrauterino com mudanças nas preferências alimentares infantis ou futuras.

Estudos clínicos que avaliem a interação dos ambientes de estresse materno e especificamente o consumo de n-3 PUFAS em desfechos infantis são desconhecidos.

2.4.2. Aspectos Metabólicos X Estresse - Parte Experimental

Modelos experimentais em animais têm sido utilizados com frequência para investigar os mecanismos do desenvolvimento da programação (Rkhzay-Jaf *et al.*, 2012). Em estudo realizado com macacos, o estresse aplicado durante um período crítico resultou no surgimento de obesidade e resistência insulínica na idade da peripuberdade (Kaufman *et al.*, 2007). Em ratos, ambientes fetais pré-natais adversos (obesidade, hiperglicemia e desnutrição) podem afetar a expressão de genes que levam ao desenvolvimento da DM tipo 2 nos filhotes (Kamel, 2012). Estudo experimental realizado também com ratos demonstrou preferência por alimentos ricos em lipídios em animais submetidos à restrição proteica intraútero (Bellinger *et al.*, 2004).

Em relação à interação entre a deficiência de n-3 PUFAs e o modelo separação materna, estudos realizados por Mathieu *et al.*, (Mathieu *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2011) investigaram, de maneira transgeracional, os resultados de acordo com diferentes desfechos comportamentais em ratos adultos. Estes estudos demonstraram que os animais submetidos à separação e à dieta deficiente em n-3 PUFAs eram mais medrosos e ansiosos, enquanto sua capacidade de lidar com a fuga mantinha-se inalterada. Além disso, tanto a dieta deficiente quanto a separação materna aumentaram a resposta à recompensa e à impulsividade nos animais, sugerindo que o ambiente de déficit nutricional a n-3 PUFAs pode ser considerado de risco para o aumento da vulnerabilidade a respostas induzidas pelo estresse crônico.

Estudos experimentais que avaliem a interação entre a deficiência de n-3 PUFAS e o modelo separação em aspectos metabólicos de ratos são desconhecidos.

3. JUSTIFICATIVA

Não há dados na literatura envolvendo a interação da deficiência de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), principalmente, o ômega-3, da dieta com o estresse sobre o crescimento intrauterino do recém-nascido e aspectos metabólicos ao nível experimental.

Este estudo almeja apresentar achados que possam elucidar as relações entre consumo ou deficiência de PUFAs nos aspectos clínicos precoces e experimentais relacionados a variáveis ao longo da vida.

Os achados advindos deste estudo apresentam-se na vanguarda do tema aqui abordado contribuindo significativamente para o tema.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS CLÍNICOS

O objetivo principal da coorte IVAPSA constitui-se em compreender os efeitos de variações ambientais perinatais sobre o crescimento, nutrição, comportamento, metabolismo e neurodesenvolvimento do indivíduo, assim como identificar a vulnerabilidade para efeitos deletérios destas variações.

Esta tese teve o foco específico, inserido na coorte IVAPSA, de determinar o impacto da interação do consumo alimentar, principalmente os lipídios, em gestantes expostas ou não expostas a diferentes condições de risco como o peso ao nascer do lactente.

4.2 OBJETIVO EXPERIMENTAL

Estudar os mecanismos da interação entre estresse neonatal (separação materna) e deficiência de ômega-3 da dieta ao longo da vida em desfechos nutricionais e metabólicos em ratos adultos.

5. HIPÓTESES DE TRABALHO

A hipótese deste estudo translacional é de que o consumo reduzido de ácidos graxos poliinsaturados, associado ou influenciado por agravos neonatais ou maternos (como os ambientes intrauterinos diversos no modelo clínico ou a separação materna no modelo experimental), pode alterar o crescimento intrauterino (como peso ao nascer no modelo clínico) e agravar aspectos nutricionais e metabólicos (como consumo alimentar, peso corporal, gordura abdominal, perfil lipídico e hormônios no modelo experimental) ao longo da vida.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 PARTE CLÍNICA

6.1.1 Delineamento

Trata-se de uma coorte múltipla prospectiva controlada, utilizando amostra de recém-nascidos (RNs) de acordo com exposição ou não a condições intrauterinas diversas, tais como: exposição à diabetes, hipertensão, tabagismo e restrição de crescimento intrauterino (RCIU) idiopático, comparados a um grupo controle. Portanto, o grupo exposto foi constituído por RN expostos a aquelas condições durante o período pré-natal. A amostra foi selecionada de maneira consecutiva e de conveniência, de acordo com a exposição ao fator, até atingir o número de pares mãe-RN calculado. A primeira fase do projeto foi intitulada como: “IVAPSA - Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Recém-Nascido nos Primeiros Seis Meses de Vida” e o protocolo inicial do estudo foi publicado (Bernardi *et al.*, 2012).

6.1.2 Amostra

A amostra foi dividida em cinco grupos causais de exposições intrauterinas adversas, considerando-se os critérios a seguir:

Grupo de Tabagistas (GTAB): puérperas que afirmaram ter fumado durante a gestação;

Grupo com Diabetes (GDM): puérperas com diagnóstico de diabetes tipo 1, tipo 2 ou gestacional;

Grupo com Hipertensão (GHAS): incluindo-se as puérperas com diagnóstico prévio de pré-eclâmpsia; eclâmpsia; pré-eclâmpsia superposta à hipertensão crônica; hipertensão crônica ou hipertensão gestacional;

Grupo de Recém-nascidos com RCIU idiopático (GRCIU): incluindo-se neste grupo RNs a termo que estivessem abaixo do percentil 5, segundo os parâmetros da curva de Alexander (Alexander *et al.*, 1996);

Grupo Controle (GCON): constituindo-se de puérperas sem qualquer dos fatores de risco em estudo durante ou prévio a gestação e que tiveram RNs sem RCIU idiopático.

Priorizou-se a coleta de grupos “puros” quanto ao fator em estudo, porém caso houvesse puérperas com condições concomitantes, o entrevistador foi orientado a preencher as questões referentes aos grupos específicos e discutir com os supervisores da pesquisa quanto à classificação do par puérpera-RN.

Foram incluídas no estudo puérperas atendidas no Grupo Hospitalar Conceição (GHC) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), residentes na cidade de Porto Alegre, RS. Não incluiu-se na amostra as puérperas soropositivas, aquelas com idade gestacional inferior a 37 semanas e gravidez gemelar ou aqueles RNs com doenças crônicas, congênitas ou que necessitaram de internação hospitalar.

6.1.3 Logística do Estudo

A entrevista inicial ocorreu de 24 a 48 horas pós-parto no alojamento conjunto dos Hospitais (HCPA ou GHC) e cinco acompanhamentos pós-neonatais ocorreram aos 7 e 15 dias e em 1, 3 e 6 meses de vida da criança, sendo três dessas visitas domiciliares (7 e 15 dias e 3 meses) e dois encontros agendados no Centro de Pesquisa Clínica

(CPC) do HCPA (1 e 6 meses). Para esta pesquisa, utilizaram-se apenas os dados da entrevista inicial e aos 7 dias.

Assim, diariamente, os pesquisadores do projeto foram ao alojamento conjunto do GHC e HCPA verificar os nascimentos ocorridos e as características das puérperas, por meio de análise de arquivos médicos, para posteriormente, classificá-las e alocá-las nos grupos previamente definidos. Antes do início da coleta, os supervisores clínicos e entrevistadores (estudantes de biomedicina, enfermagem, medicina e nutrição) foram treinados e certificados pela coordenação do estudo para uniformizar a coleta de dados.

Nesta primeira entrevista, foram explicados os objetivos do projeto, entregue o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - Apêndice I) e após concordância das puérperas foi então aplicado o questionário de coleta dos dados retrospectivos. Também foram coletados dados antropométricos dos RNs, tais como peso, comprimento, além do sexo e das mães, tais como peso pré-gestacional e peso antes do parto (Questionário Geral – Apêndice II).

Na visita domiciliar agendada próxima aos 7 dias de vida dos RNs, as mães foram orientadas quanto aos retornos ao CPC do HCPA e aos encontros domiciliares posteriores. Na primeira entrevista domiciliar (7 dias) os aspectos referentes ao comportamento alimentar das gestantes foram avaliados utilizando-se o Questionário de Frequência Alimentar (QFA - Apêndice III).

6.1.4 Variáveis Estudadas

Foram coletados alguns dados retrospectivos das gestantes, como: peso pré-gestacional (em Kg; relatado) e peso antes do parto (em Kg; do prontuário), determinando-se o ganho de peso gestacional (obtido pela diferença entre o peso final

da gestação e o pré-gestacional) e a razão entre o ganho de peso gestacional e o pré-gestacional (em percentual).

Em relação aos dados das puérperas, foram utilizadas variáveis socioeconômicas e demográficas, como data de nascimento (para o cálculo da idade), cor da pele (branca, preta, amarela, parda e indígena, classificada como branca e não branca), escolaridade (anos de estudo) e classe socioeconômica familiar (questionário pré-codificado, segundo Critério de Classificação Econômica Brasil) (Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa, 2011). Este questionário possibilitou a identificação da classe socioeconômica da família através do questionamento sobre a presença e quantidade de determinados itens na residência, além do grau de instrução do chefe da família. Entre os itens avaliados foram: televisor em cores, videocassete/DVD, rádio, banheiro, automóvel, empregada mensalista, máquina de lavar, geladeira e freezer. Após a aplicação do questionário, realizou-se a soma da pontuação referente às respostas e foi definida a classe socioeconômica da família, sendo dividida em A1 (42-46 pontos), A2 (35-41 pontos), B1 (29 a 34 pontos), B2 (23-28 pontos), C1 (18 a 22 pontos), C2 (14 a 17 pontos), D (8 a 13 pontos) e E (0 a 7 pontos).

As crianças foram avaliadas por meio de dados ao nascimento, retirados dos prontuários médicos: sexo (feminino ou masculino), peso (em gramas), comprimento (em cm) e perímetro cefálico (em cm). O baixo peso ao nascer (RNBP) foi definido como aquele inferior a 2500g (OMS, 1998).

Na segunda entrevista do acompanhamento com a puérpera, o consumo alimentar retrospectivo das gestantes foi avaliado utilizando-se um questionário de frequência alimentar (QFA) semiquantitativo adaptado de um QFA previamente validado para gestantes (Giacomello *et al.*, 2008). O instrumento apresenta oito opções de frequência de consumo que variam de “mais de três vezes ao dia” até “nunca ou

quase nunca”. A lista de alimentos do QFA original continha 88 itens alimentares, no qual houve o acréscimo de 9 alimentos para discriminar os itens fontes de AG (2 itens foram subdivididos: “peixe” em “peixe branco” e “peixe oleoso”; “peixe enlatado” em “atum” e “sardinha”; inclusão de 6 itens alimentares: “óleo utilizado para temperar saladas”; “óleo para cozinhar preparações”; “banha de porco”; “linhaça”; “oleaginosas” e “cápsula de óleo”), além do questionamento da utilização de “adoçantes”. Os alimentos questionados avaliaram a quantidade consumida na gestação, já que a entrevistada referia seu hábito de consumo. A cada 4 ou 5 alimentos questionados o entrevistador foi orientado a lembrar a puérpera que o questionário se referia a alimentação durante toda a gestação. A quantidade consumida dos alimentos “óleo para temperar saladas”, “óleo para cozinhar preparações” e “banha de porco” foram ajustados de acordo com o número de indivíduos na casa.

Para determinar a quantidade em gramas (g) ou mililitros (ml) das porções padronizadas, isto é, a porção correspondente à medida caseira pré-estabelecida no QFA, foi utilizada a tabela de Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (Pinheiro *et al.*, 2004). Os alimentos não contemplados na tabela foram pesados ou medidos em balança digital da marca *Plenna*®, a fim de se obter um valor padrão em gramas (g) ou miligramas (mg) ou microgramas (mcg). Alguns itens presentes no QFA contemplavam mais de um subtipo de alimento nas tabelas de composição, como a banana, que, na tabela de Pinheiro (Pinheiro *et al.*, 2004) apresenta cinco tipos diferentes: banana-d’água, banana-da-terra, banana-maçã, banana-ouro e banana-prata. A média de todos os subtipos foi calculada nesses casos para obter um valor em g ou ml que considerasse a variabilidade do alimento *per si*. Da mesma forma, realizou-se a média das medidas caseiras para alimentos com distintas preparações (cozidos,

refogados, fritos), que não estavam delimitados no QFA (exemplos: abóbora, frango, salgados).

As frequências de consumo dos alimentos foram convertidas em equivalentes diários, cujos valores atribuídos foram: "mais de três vezes/dia" = 3; "duas a três vezes/dia" = 2; "uma vez/dia" = 1; "cinco a seis vezes/semana" = $0,79(=[(5+6)/2]/7)$; "duas a quatro vezes/semana" = $0,43(=[(2+4)/2]/7)$; "uma vez/semana" = $0,14(=1/7)$; "uma a três vezes/mês" = $0,07(=[(1+3)/2]/30)$; "nunca/quase nunca" = 0 (Melere *et al.*, 2013).

Para este trabalho, para cada item alimentar, calculou-se o valor de macronutrientes, AG saturados (12:0, 14:0, 16:0, 18:0 e total), AG monoinsaturados (16:1, 18:1, 20:1 e total), AG poliiinsaturados (18:2 n-6, 18:3 n-3, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 22:6 n-3 e total) e o valor energético total (em Kcal). Calculou-se a razão entre n-6 (soma dos AG 18:2 e 20:4) e n-3 (soma dos AG 18:3, 20:5, 22:5 e 22:6). Os AG escolhidos para as análises compreenderam aqueles representados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (UEC & NEPA., 2011).

Inicialmente utilizou-se a TACO (UEC & NEPA., 2011) como referência para obtenção da composição nutricional dos alimentos, porém em função da Tabela Americana de Composição de Alimentos (USDA, 2012) possuir maior disponibilidade dos valores de AG, optou-se pela segunda. Os rótulos dos alimentos foram consultados como última opção.

A estimativa de consumo de cada nutriente foi consolidada com base no cálculo de que o total de nutriente de um alimento equivale ao número de porções deste alimento multiplicado pela frequência de ingestão diária do alimento e multiplicada pela proporção do nutriente em cada porção. Foi criada uma sintaxe para construção desse

cálculo no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA®).

Os valores encontrados de macronutrientes: carboidratos (45 a 65%), proteínas (10 a 35%), lipídios totais (20 a 35%) (Trumbo *et al.*, 2002), AG saturados (<10%), AG monoinsaturados (10 a 15%), AG poliinsaturados (7 a 10%) (Holt, 2003) e DHA (200 a 300mg) (Jordan, 2010) foram comparados segundo as recomendações específicas para gestantes.

6.1.5 Cálculo Amostral

O tamanho da amostra do projeto maior foi calculado considerando a possibilidade de detecção de 0,50 desvios-padrão de diferença entre as médias de escore-z de peso corporal aos 12 meses de idade, grau de significância de 5% e poder do teste de 80%. O número previsto foi de 72 pares mãe-RN por grupo e 144 no grupo controle. Calculando-se perda de 20% dos indivíduos ao longo do seguimento, o tamanho da amostra final constitui-se de 521 pares mãe-RN.

Em relação ao cálculo específico para esse projeto, o tamanho amostral foi calculado considerando correlação mínima moderada de 0,3 entre as variáveis consumo de AG pela mãe e PN, grau de significância de 5% e poder do teste de 80% (Callegari-jacques, 2003). O número previsto foi de 150 pares mãe-RN, com o mínimo de 20 pares por grupo.

6.1.6 Qualidade dos Dados

Cada par mãe-RN obteve seu número de identificação específico, correspondendo aos questionários realizados, mantendo-se dessa forma, o anonimato dos participantes.

Houve revisão dos questionários pelos supervisores do projeto e o banco de dados foi desenvolvido no Programa *Epi Info*® versão 6.0 com dupla digitação com posterior conferência e validação dos dados.

6.1.7 Análises Estatísticas

O desfecho principal analisado foi ao peso ao nascer.

As covariáveis maternas analisadas foram: consumo alimentar retrospectivo, idade, cor da pele, peso pré-gestacional, ganho de peso gestacional e sua razão proporcional. As covariáveis psicossociais escolhidas foram: escolaridade materna e classe socioeconômica familiar. As covariáveis dos RNs analisados foram: comprimento ao nascer, perímetro cefálico e sexo.

Variáveis contínuas e categóricas inicialmente foram analisadas descritivamente. Dados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). O teste qui-quadrado, teste t de *student* ou ANOVA de uma via (*post hoc Tukey*) foram utilizados nas análises sem os ajustes para detectar diferenças entre proporções e médias, respectivamente, entre os grupos.

Para detectar as diferenças entre o desfecho analisado e os grupos com os ajustes necessários (Tabela 3: cor da pele, idade materna, escolaridade materna e peso pré-gestacional ou Tabela 4: idade materna, escolaridade materna, sexo e peso pré-gestacional) foi utilizado o modelo de regressão linear múltipla (GLM - *Generalized Linear Models*), seguido de comparações múltiplas com correção de *Bonferroni*. Para todas as análises, foi considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e intervalo de confiança de 95%. Os dados foram analisados por meio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA®).

6.1.8 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa do GHC e HCPA, com os números de protocolos 11-027 e 11-0097, respectivamente.

Os responsáveis assinaram o TCLE, em duas vias, ficando uma com o responsável e a outra com o pesquisador. No TCLE constavam todos os procedimentos realizados durante o acompanhamento e objetivos do estudo. Os indivíduos que necessitassem de atendimento de saúde foram encaminhados a Unidade Básica de Saúde (UBS) de origem. Em situações que caracterizassem urgência ou emergência os indivíduos foram encaminhados ao serviço de emergência do HCPA.

6.2 PARTE EXPERIMENTAL

6.2.1 Delineamento

Trata-se de um estudo experimental com animais, no qual se utilizou modelo de estresse neonatal e protocolo nutricional com dieta contendo n-3 PUFAs.

6.2.2 Amostra

Ratas *Wistar* prenhas nulíparas, provindas do mesmo fornecedor, acasaladas na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA, foram selecionados aleatoriamente para o estudo. Os animais foram alojados individualmente em caixas-moradias confeccionadas em “plexiglas”, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho coberto de maravalha, sendo submetidos a um ambiente controlado (luzes acendem às 7 horas e apagam às 19 horas, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, limpeza semanal da caixa-moradia, ração e água *ad libitum*). Oito filhotes por ninhada, selecionados aleatoriamente, foram mantidos intactos, com exceção do procedimento de separação, realizado entre 15:30 horas e 19 horas. Os demais filhotes foram sacrificados em até 24 horas após o nascimento.

Nos dias próximos ao final da gestação, as fêmeas foram avaliadas diariamente para determinação da data de nascimento. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o dia pós-natal (DPN) 0 e o desmame foi considerado o DPN 21. Um ou dois filhotes machos de cada ninhada foram usados por grupo por experimento. Foram alojados entre 2 e 3 ratos por caixa-moradia, de origem semelhante às descritas acima. Sessenta e dois ratos machos foram usados nos diferentes experimentos, derivados a partir de 12 ninhadas diferentes. Os ratos tiveram livre acesso a comida (ração padrão de laboratório) e água, até o DPN 35, quando as diferentes dietas (especialmente

formuladas para este estudo) foram iniciadas. Foi escolhido o DPN 35 para iniciar a dieta, porque outros modelos experimentais já exploraram o efeito a longo prazo da deficiência de n-3 PUFA logo após o desmame (Mathieu *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2011). Com o objetivo de investigar aspectos potenciais de estudos translacionais, houve interesse em observar os efeitos da deficiência de n-3 PUFA durante a adolescência, período em que os seres humanos começam a ser mais independentes de seus pais, em termos de opções de alimentos.

6.2.3 Modelo de Estresse Neonatal

Os animais foram subdivididos em:

Grupo Não-Manipulado (GNM): os filhotes foram preservados de manipulações até o desmame. Os animais foram manejados apenas pelo investigador para a troca parcial da maravalha, sendo cuidadosamente removida a partir de um dos lados da caixa-moradia, sem perturbar a mãe e o ninho, e substituído por maravalha limpa no mesmo lado;

Grupo Separação Materna (GSM): os filhotes foram retirados da caixa-moradia e foram colocados em caixa-moradia limpa e forrada com papel toalha limpa, dentro de uma incubadora a 32°C. Após 3 horas, os filhotes foram devolvidos às suas mães. A separação materna neonatal foi iniciada no dia seguinte ao nascimento (DPN 1) e continuou até o décimo dia de vida dos filhotes (DPN 10). Após, os filhotes foram deixados em repouso até o DPN 21. No período da separação está incluído o tempo para montar a incubadora, trazer as caixas-morádias rapidamente do ratário e habitué-las para a nova sala, realizar a remoção cuidadosa dos filhotes do ninho, o momento da separação, por si só, o retorno dos filhotes para o ratário e, novamente depois de um breve período, o retorno da caixa-moradia para o ratário. O pesquisador também trocou

suas luvas para o procedimento de cada ninhada e assim evitar a propagação de qualquer tipo de odor entre os ninhos.

Após o desmame, aos 21 dias, os animais foram separados por sexo e apenas os machos foram expostos às dietas. As fêmeas foram alocadas para outro experimento.

6.2.4 Grupos Dietéticos e Composição das Rações

Os animais (n=62) foram subdivididos em dois grupos dietéticos: dieta contendo quantidade adequada em n-3 PUFAs (n=29) ou deficiente em n-3 PUFAs (n=33), sendo caloricamente e nutricionalmente equilibradas, fabricadas especialmente para este estudo (PragSoluções Biociências®, São Paulo, Brasil). Os animais foram expostos à dieta do DPN 35 até 15 semanas de vida. A dieta foi adaptada de Mathieu *et al.*, (Mathieu *et al.*, 2008). O consumo alimentar e o peso corporal foram mensurados semanalmente em balança digital (Marte®, AS2000C, São Paulo, Brasil), em todos os grupos (n=14 a 17 para cada um dos 4 grupos). O consumo de ração foi medido para cada caixa-moradia e o cálculo foi feito pelo consumo médio por animal por caixa-moradia (n=número de caixa-moradias=29).

Sobre a composição nutricional, as dietas continham 4,1Kcal por grama, sendo 58,54% de carboidratos, 19,51% de proteína e 21,95% de lipídeo (fontes: gordura de coco, óleo de canola e óleo de linhaça). As densidades dos óleos eram de 90,5g/100ml e 89,0g/100ml para o óleo de canola e linhaça, respectivamente. As proporções foram n-6/n-3 de 1,83 e 5,02 para as dieta adequada e deficiente, respectivamente (Hibbeln *et al.*, 2006; Dupont, 2009). A Tabela 1 mostra a composição e o perfil de AG de cada dieta.

Tabela 1 - Composição da dieta.

Ingredientes	n-3 PUFAs Adequada (para 1000g)	n-3 PUFAs Deficiente (para 1000g)
Proteína isolada de soja	200,0	200,0
Dextrose	200,0	200,0
Amido de milho	150,0	150,0
Maltodextrina	150,0	150,0
Sucralose	100,0	100,0
Gordura de côco	60,0	66,0
Óleo de canola	32,0	34,0
Óleo de linhaça	8,0	0,0
Celulose microcristalina	50,0	50,0
Mix mineral	35,0	35,0
Mix vitamínica	10,0	10,0
Cloreto de colina	2,5	2,5
L-cistina	2,5	2,5
Hidroxitolueno Butilado	0,0	0,0
Composição de Ácido Graxo (% do teor de ácidos graxos totais)		
8:0	1,0	1,2
10:0	1,3	1,6
12:0	21,4	23,7
14:0	11,6	12,4
15:0	0,0	0,0
16:0	8,9	9,1
16:1 n-7	0,1	0,1
17:0	0,1	0,1
18:0	4,1	3,9
18:1 n-9	30,9	31,5
18:1 n-7	1,6	1,6
18:2 n-6	11,2	10,9
20:0	0,4	0,4
18:3 n-6	0,3	0,3
20:1 n-9	0,7	0,7
18:3 n-3	6,3	2,2
20:2 n-6	0,0	0,0
24:0	0,2	0,2
24:1 n-9	0,1	0,1

6.2.5 Dissecção de Gordura Abdominal e Coleta de Tecidos

Após as 15 semanas de dieta e após 6 horas de jejum, os ratos foram decapitados entre 13 horas e 16 horas em ordem aleatória usando guilhotina de pequenos animais (*Insight®* EB271, São Paulo, Brasil). Alíquotas de sangue total do tronco foram coletadas para obtenção, em centrífuga de alta rotação (3000 rpm, 15 min), de soro e plasma. Estes foram armazenados a -80°C para a determinação posterior da glicose, colesterol (total e HDL) triglicérido (TG), insulina e leptina. Uma pequena porção do fígado, bem como todo o cérebro foram rapidamente removidos, congelados em imersão de isopentano e as amostras foram armazenadas a -80°C até o processamento. As duas porções principais de gordura abdominal (depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e gonadais) foram dissecadas e pesadas.

6.2.6 Determinação da Composição de Ácidos Graxos da Dieta e do Sangue Periférico

O conteúdo de lipídeo da dieta foi extraído com clorofórmio-metanol (Bligh & Dyer, 1959). Alíquotas (2-3 ml) de extrato lipídico no clorofórmio foram evaporados a 50°C utilizando bomba de vácuo, seguida por saponificação em solução metanólica de KOH e esterificação em solução metanólica de H_2SO_4 (Hartman & Lago, 1973).

Os AG foram esterificados no sangue e extraídos utilizando reação de uma etapa (Lepage & Roy, 1986), com algumas modificações. O sangue (100 μl) foi misturado com 2 ml de metanol/isooctano (v/v 4:1) e 200 μL de cloreto de acetila e foi incubado a 100°C durante 60 min., em seguida, 60g/l de carbonato de potássio aquoso contendo 100g/l de cloreto de sódio foi adicionado. A mistura foi agitada durante 10 min. à temperatura ambiente e centrifugada a 1800 g durante 5 min., para se obter a fase de iso-octano, que contém os ésteres metílicos dos AG.

As amostras esterificadas foram analisadas utilizando-se cromatógrafo gasoso *Agilent Technologies*® (HP 6890) equipado com uma coluna *Supelco*® SP-2560 capilar (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm) e detecção de ionização de chama. A temperatura do orifício injetor e do detector foi ajustado a 250°C e o gás de transporte de azoto foi de 1,0 ml/min. Após injeção (1µL, razão de separação 50:1), a temperatura do forno foi mantida a 140°C durante 3 min., aumentada para 170°C durante 2 min., a uma taxa de 6°C min⁻¹, depois a temperatura foi aumentada para 185°C e 240°C a uma taxa de 3°C min⁻¹ e mantidas a estas temperaturas durante 6 min. e 7 min, respectivamente. Os padrões de ésteres metílicos dos AG (37-Componentes FAME, DPA n-3 PUFA e no. 2 a partir de Sigma, *Saint Louis*, MO, EUA e DPA n-6 a partir de NuChek Prep. Inc., *Elysian*, MN, EUA) foram corridos sob as mesmas condições e tempos de retenção prévios e foram usados para identificar os AG expressos em percentagem do teor de AG totais.

6.2.7 Análises Bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos foram medidos em uma subamostra representativa de 30 ratos, uma vez que após as 15 semanas de exposição às dietas, os outros animais (n=32) foram submetidos a testes comportamentais previstos no projeto (Ferreira *et al.*, 2013), mas não relacionados aos resultados metabólicos, haja vista que esses testes podem afetar os resultados. Glicose, colesterol e frações e TG plasmáticos foram medidos através de kits comerciais (*Wiener Lab Group*®, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Insulina e leptina séricas foram medidas utilizando-se kits ELISA comercialmente disponíveis (*Millipore*®, EZRMI-13K, Missouri, EUA, e *Invitrogen*®, KRC2281, Califórnia, EUA, respectivamente). O índice de HOMA (Modelo de Avaliação da Homeostase) foi calculado a partir dos níveis plasmáticos de

insulina e glicose em jejum dividido por 22,5 (Matthews *et al.*, 1985). O hipotálamo foi dissecado a partir de todo o cérebro a -20°C e as amostras foram homogeneizadas em tampão de extração nuclear I (NEB1 - 10 mM de HEPES, 10 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de EGTA, pH 7,9) com um inibidor da protease (100:1). Em seguida, o detergente NP40 a 1% foi adicionado e o homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm durante 10 min. a 4°C. O sobrenadante (fração citosólica) foi utilizado para a quantificação posterior do neuropeptídeo Y (NPY) utilizando-se kit de imunoenensaio enzimático comercialmente disponível (*Península Laboratories LCC®*, Califórnia, EUA).

6.2.8 qPCR (Reação em cadeia da polimerase quantitativa) em Tempo Real

Para a avaliação genética, a expressão de PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) foi determinada a partir do RNA (ácido ribonucleico) total extraído do fígado. A extração do RNA foi realizada com Reagente TRI (*Invitrogen®*) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram medidas com o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (*Technologies®*, NanoDrop Montchanin, DE, EUA). É bem estabelecido que as relações de absorbâncias a 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm são utilizados para avaliar a pureza do RNA. Todas as amostras foram analisadas e as razões de 2,0 e cerca de 2,0-2,2, respectivamente, foram aceitas como amostras de RNA puros. A seleção de GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como controle endógeno foi baseada em vários estudos que demonstraram a eficácia da sua expressão no fígado de ratos (Kang *et al.*, 1999; Pfaffl & Windisch, 2003; Soyalan *et al.*, 2011). Apesar de não ter sido realizado teste de expressão de um conjunto de diferentes controles internos, a expressão GAPDH não variou entre as amostras testadas (dados não apresentados), o que justifica o seu uso.

Todas as reações foram realizadas em triplicata, com o 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*®). Um micrograma de RNA total foi reversamente transcrito em cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) usando o kit de Transcrição Reversa *High Capacity* cDNA (P/N: 4368814, *Applied Biosystems*®, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante, e o cDNA resultante foi armazenado a -80°C até a realização da qPCR em Tempo Real. Todos os cDNAs foram diluídos a 1:10 antes de serem usados como molde de PCR. Esta diluição foi determinada após realização de uma curva padrão. Pares de iniciadores específicos e de sondas TaqMan MGB marcado com FAM para PEPCK (Rn 01529014_m1, *Applied Biosystems*®) foram utilizados. Primers para GAPDH e uma sonda (43523388E, *Applied Biosystems*®) marcada com VIC foram utilizados como controle endógeno. Os níveis de expressão relativa foram determinados pelo método de DDCT (Livak & Schmittgen, 2001).

6.2.9 Cálculo Amostral

Para detectar diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando $\alpha = 0,05$ e poder de confiança de 90% (Mathieu *et al.*, 2008). O número previsto foi de 7-8 animais por grupo em cada uma das análises.

6.2.10 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como médias \pm SEM (erro padrão da média) e analisados pelo teste t de *student*, análise de variância (ANOVA) de duas vias ou de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post hoc* LSD (*Fisher's Least Significant Difference*), quando indicado. Os dados sobre a expressão do gene da PEPCK não tinham distribuição normal e, portanto, foram transformados em valores logaritmos para

a análise. Correlações de *Pearson* foram realizadas entre os níveis de AG e diferentes desfechos (AG 18:0 e índice de HOMA; insulina; níveis de triglicerídeos; AG 16:1 n-7 e deposição de gordura abdominal). Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os dados coletados foram digitados e analisados no programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*; SPSS Inc, Chicago, IL) versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA®).

6.2.11 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do HCPA) sob número de protocolo 09-410 e seguiu as recomendações do Conselho Internacional de Ciência em Animal de Laboratório (ICLAS). Todos os cuidados necessários foram realizados para minimizar a dor ou desconforto dos animais.

7. RESULTADOS

7.1 PARTE CLÍNICA

7.1.1 Características Gerais

A coorte IVAPSA encontra-se em andamento, portanto, para este estudo, utilizaram-se os dados referentes ao período de coleta entre Setembro de 2011 a Julho de 2013. Selecionou-se 255 puérperas elegíveis, sendo que 218 (85,5%) aceitaram participar da pesquisa. As perdas de seguimento, em relação ao preenchimento do questionário de frequência alimentar (QFA), representaram 16,5% (n=36) da amostra. O fluxograma de seleção da pesquisa, de acordo com a distribuição dos diferentes grupos, está representado na Figura 1.

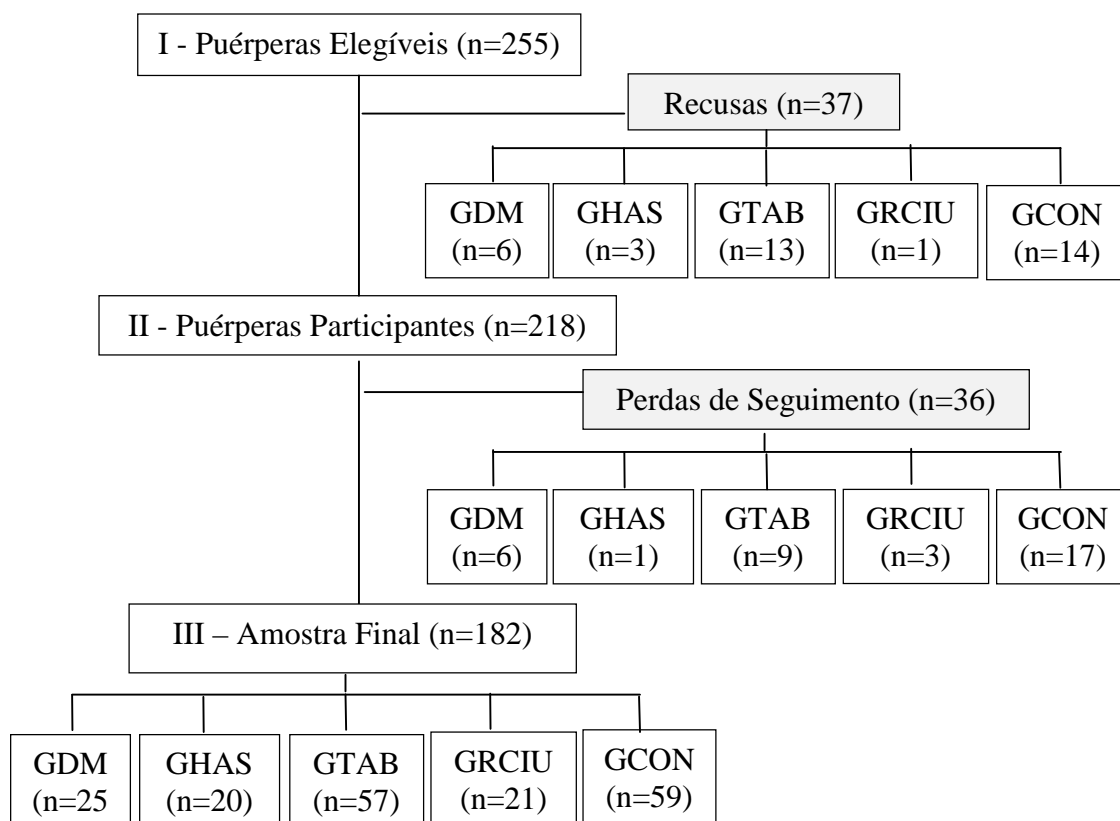


Figura 1 - Fluxograma da coleta de dados.
(Coorte IVAPSA, Porto Alegre, Setembro-2011 a Julho-2013).

Ao comparar-se puérperas elegíveis (n=218) com as recusadas (n=37) não houve diferença significativa das variáveis: idade e escolaridade materna e peso do RN (Tabela 1). Os motivos mais relatados pelas recusadas foram: desinteresse na participação da pesquisa (n=13), razões relacionadas ao trabalho (n=8) e mudança de endereço (n=6), dentre outros. Já, as puérperas do seguimento (n=182) apresentaram média de idade superior (p=0,010) em relação às perdas (n=36), comparando-se as variáveis da Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação às demais variáveis analisadas (p>0,05).

Tabela 1 - Características sociodemográficas e antropométricas da amostra, perdas e recusadas.

(Coorte IVAPSA, Porto Alegre, Setembro-2011 a Julho-2013).

Grupos	Amostra Geral	Perdas (n=36)	Recusadas (n=37)	p valor*
Variáveis Sociodemográficas		n (%)		
Idade da puérpera (anos) (média ± DP)	26,5 (± 6,8) ¹ 26,1 (± 6,6) ²	23,9 (± 5,1)	27,4 (± 6,8)	0,010 ^{1**} 0,273 ²
Cor da pele da puérpera:				
Branca	107 (58,8)	17 (47,2)	-	0,200
Não Branca	75 (41,2)	19 (52,8)		
Escolaridade da puérpera (anos de estudo) (média ± DP)	8,99 (± 2,7) ¹ 8,87 (± 2,6) ²	8,27 (± 1,9)	8,8 (± 2,3)	0,060 ¹ 0,855 ²
Classe socioeconômica:				
A2	0 (0,0)	1 (2,9)		
B1	6 (3,3)	1 (2,9)		
B2	54 (30,0)	7 (20,0)		
C1	62 (34,4)	15 (42,9)	-	0,279
C2	45 (25,0)	8 (22,9)		
D	11 (6,1)	2 (5,7)		
E	2 (1,1)	1 (2,9)		
Variáveis Antropométricas		Média ± DP		
Peso pré-gestacional (Kg)	64,7 (±14,7)	63,25 (±12,5)	-	0,415
Ganho peso gestacional (Kg)	13,2 (±7,0)	14,03 (±6,0)	-	0,538
Razão ganho peso/peso pré (%)	21,5 (±11,7)	22,96 (±9,7)	-	0,531
Peso ao nascer (g)	3168,2(±457,0) ¹ 3191,4(±482,0) ²	3308,1(±516,0)	3269,9(±576,8)	0,112 ¹ 0,381 ²
Comprimento ao nascer (cm)	48,3 (±2,3)	48,5 (±2,2)	-	0,736
Perímetro cefálico (cm)	33,8 (±1,5)	33,9 (±1,7)	-	0,907

* Teste t de *student* (variáveis contínuas) ou qui-quadrado (variáveis categóricas) entre a amostra geral x perdas (n=182)¹ e entre a amostra geral x recusadas (n=218)².

** Resultado estatisticamente significativo: valor de p <= 0,05.

Assim, 182 puérperas foram avaliadas na entrevista do pós-parto com seguimento domiciliar e preenchimento do QFA aos 7 dias de vida da criança. O número de pares mãe-RN por grupo de estudo variou de 20 a 59.

A Tabela 2 demonstra a distribuição das variáveis sociodemográficas entre os grupos avaliados, sendo a média de idade das mães no GHAS superior à média de idade das mães nos GTAB ($p=0,026$) e GRCIU ($p=0,030$). Em relação às variáveis antropométricas maternas, o GRCIU apresentou peso pré-gestacional médio inferior em comparação ao GDM ($p=0,022$) e GHAS ($p=0,003$). Por sua vez, as mães do GHAS apresentaram peso médio e ganho de peso gestacional superior em relação ao GCON ($p=0,040$; $p=0,014$).

Em relação às variáveis antropométricas infantis, os pesos dos RNs do GRCIU foram inferiores aos demais grupos ($p<0,001$), enquanto que o peso do GDM foi superior ao GTAB ($p=0,017$). Tanto o comprimento ao nascer, quanto a média do perímetro cefálico apresentou valores inferiores no GRCIU comparados aos outros ($p<0,001$), exceto o GHAS no comprimento ao nascer ($p=0,096$).

Tabela 2 - Características sociodemográficas e antropométricas maternas e infantis entre os diferentes grupos. (Coorte IVAPSA, Porto Alegre, Setembro-2011 a Julho-2013).

Grupos (n=182)	GDM (n=25)	GHAS (n=20)	GTAB (n=57)	GRCIU (n=21)	GCON (n=59)	p valor*
Variáveis Sociodemográficas						
	n (%)					
Idade da puérpera (anos) (média ± DP)	28,2 (± 6,3) ^{a,b,c}	30,0 (±6,9) ^a	24, 8 (±5,6) ^{b,c}	23,9 (±5,4) ^{b,c}	27,2 (±7,9) ^{a,b,c}	0,007
Cor da pele da puérpera:						
Branca	15 (60,0)	13 (65,0)	32 (56,1)	10 (47,6)	37 (62,7)	0,744
Não Branca	10 (40,0)	7 (35,0)	25 (43,9)	11 (52,4)	22 (37,3)	
Escolaridade da puérpera (anos de estudo) (média ± DP)	9,0 (± 2,9)	9,1 (±2,4)	8,6 (±2,6)	10,1 (±1,9)	9,0 (±3,0)	0,268
Classe socioeconômica (n=180):						
B1	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,6)	0 (0,0)	4 (6,8)	
B2	10 (40,0)	8 (42,1)	12 (21,4)	8 (38,1)	16 (27,1)	
C1	8 (32,0)	5 (26,3)	20 (35,7)	6 (28,6)	23 (39,0)	0,740
C2	6 (24,0)	5 (26,3)	18 (32,1)	4 (19,0)	12 (20,3)	
D	1 (4,0)	1 (5,3)	4 (7,1)	2 (9,5)	3 (5,1)	
E	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,8)	1 (1,7)	
Variáveis Antropométricas						
	Média ± DP					
Peso pré-gestacional (Kg) (n=171)	70,1 (±12,6) ^{b,c,d}	73,3 (±15,5) ^{b,c}	63,8 (±14,7) ^{a,b,c,d}	57,0 (±12,4) ^{a,d}	62,8 (±14,3) ^d	0,002
Ganho peso gestacional (Kg) (n=165)	13,3 (±8,4) ^{a,b}	17,4 (±5,7) ^a	13,9 (±7,0) ^{a,b}	11,4 (±5,3) ^{a,b}	11,5 (±6,7) ^b	0,018
Razão ganho peso/peso pré (%) (n=165)	20,1 (±13,3)	25,1 (±10,6)	23,2 (±12,3)	20,9 (±10,1)	19,4 (±11,2)	0,305
Peso ao nascer (g) (n=181)	3435,0 (±380,9) ^{b,c}	3181,8 (±464,9) ^{b,c,d}	3129,0 (±395,6) ^{b,c,d}	2538,9 (±165,2) ^a	3311,8 (±457,3) ^{b,d}	<0,001
Comprimento ao nascer (cm) (n=181)	49,1 (±1,9) ^b	47,8 (±2,0) ^a	48,2 (±2,3) ^b	46,1 (±1,5) ^a	49,1 (±2,2) ^b	<0,001
Perímetro cefálico (cm) (n=180)	34,2 (±1,5) ^b	34,2 (±1,4) ^b	33,8 (±1,3) ^b	32,1 (±1,2) ^a	34,1 (±1,4) ^b	<0,001

* Anova de uma via e *post hoc* Tukey (variáveis contínuas) ou qui-quadrado (variáveis categóricas) entre os grupos e as variáveis independentes.

Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas nas comparações múltiplas: Idade materna: GHAS^a diferente de GTAB^b e diferente de GRCIU^c. Peso pré-gestacional: GRCIU^a diferente de GDM^b e diferente de GHAS^c; GHAS^c diferente de GCON^d. Ganho de peso: GHAS^a diferente de GCON^b. Peso ao nascer: GRCIU^a diferente dos demais grupos^b; GDM^c diferente GTAB^d. Perímetro cefálico: GRCIU^a diferente dos demais grupos^b. Comprimento ao nascer: GRCIU^a diferente dos demais grupos^b, exceto GHAS^a.

7.1.2 Características do Consumo Alimentar das Gestantes

O valor calórico médio (\pm DP) da dieta das gestantes em geral foi de 4919,0 Kcal (\pm 2833,8), variando de 1857,7Kcal a 18.059,6Kcal. Nove mães (4,9%) da coorte relataram consumir mais de 10.000Kcal diárias.

Em relação à recomendação de consumo de carboidrato, 129 (70,9%) consumiram adequadamente e 53 (29,1%) excessivamente; do mesmo modo para proteínas e lipídios totais, 7 (3,8%) e 17 (9,3%), respectivamente, apresentaram consumo insuficiente e 13 (7,1%) delas consumo excessivo de lipídios. A maioria das gestantes (n=180; 98,9%) apresentou consumo de AG saturado superior a 10%, sendo que 110 (60,4%) consumiram entre 7 a 10% de AG poliinsaturado e metade da amostra (n=91; 50%) consumiu entre 10 a 15% de AG monoinsaturado. Apenas 31 (17%) das mães consumiram 200mg de DHA diários. Cinquenta e cinco (30,2%) mães relataram consumir peixe branco na gestação, sendo os mais citados: pescada (9,3%) e merluza (8,8%) e apenas 8 (4,4%) relataram consumir peixe oleoso.

O consumo alimentar retrospectivo relatado pelas gestantes entre os grupos está demonstrado na Tabela 3. Houve diferença estatisticamente significativa no modelo, com os ajustes, apenas entre a razão n-6/n-3 entre as mães dos diferentes grupos (p=0,041), demonstrando que o GDM apresentou menor razão que as GCON (p=0,021). Além disso, o consumo de AG 20:4 n-6 foi maior nas mães hipertensas (p=0,021) em relação aos controles. Observou-se que as variáveis carboidrato, lipídio, AG 16:0, AG 18:1 e AG monoinsaturados foram influenciadas pela idade e escolaridade materna; as variáveis proteína e AG 14:0 apenas pela escolaridade materna e a variável AG 16:1 apenas pela idade materna (p<0,05).

Tabela 3 - Consumo alimentar diário retrospectivo da amostra geral e entre os diferentes grupos. (Coorte IVAPSA, Porto Alegre, Setembro-2011 a Julho-2013).

Grupos	Geral (n=171)	GDM (n=24)	GHAS (n=20)	GTAB (n=53)	GRCIU (n=20)	GCON (n=54)	p valor*
Consumo Alimentar	Média ± DP						
Calorias (Kcal)	4919,0 (±2833,8)	4072,3 (±1669,2)	5197,3 (±3175,2)	5485,2 (±3375,7)	5277,1 (±2827,6)	4509,0 (±2445,1)	0,317
Carboidrato (g) ¹	745,5 (±419,6)	619,6 (±247,1)	791,6 (±493,4)	845,4 (±508,5)	783,9 (±425,3)	672,9 (±330,3)	0,194
Proteína (g) ²	173,9 (±90,5)	150,1 (±53,4)	183,5 (±117,2)	183,5 (±96,8)	188,0 (±83,3)	166,3 (±89,1)	0,636
Lipídio (g) ¹	149,5 (±112,0)	119,6 (±63,7)	158,3 (±100,7)	163,7 (±134,1)	166,5 (±120,2)	139,3 (±104,6)	0,596
12:0 (g)	2,1 (±2,6)	1,5 (±1,9)	2,8 (±2,1)	2,2 (±3,3)	2,5 (±3,4)	1,9 (±1,7)	0,529
14:0 (g) ²	4,6 (±3,7)	3,6 (±2,2)	5,4 (±3,2)	4,7 (±4,6)	5,3 (±4,3)	4,4 (±3,1)	0,454
16:0 (g) ¹	29,2 (±21,5)	23,0 (±12,4)	30,9 (±18,5)	32,4 (±26,5)	32,9 (±23,3)	26,7 (±19,0)	0,415
18:0 (g)	14,1 (±11,3)	11,0 (±6,6)	14,3 (±8,3)	16,2 (±14,8)	16,1 (±11,8)	12,7 (±9,1)	0,356
Saturado (g)	55,65 (±41,7)	44,3 (±23,9)	59,7 (±34,4)	61,6 (±53,3)	63,1 (±46,6)	50,7 (±34,1)	0,430
16:1 n-7 (g) ³	2,3 (±2,1)	1,8 (±1,1)	2,3 (±1,6)	2,4 (±2,3)	2,5 (±2,2)	2,2 (±2,3)	0,808
18:1 n-9 (g) ¹	48,1 (±40,5)	36,7 (±19,9)	49,8 (±31,5)	53,1 (±46,9)	53,5 (±40,6)	45,8 (±42,8)	0,672
20:1 n-9 (g)	0,4 (±0,3)	0,3 (±0,3)	0,3 (±0,3)	0,4 (±0,3)	0,5 (±0,6)	0,3 (±0,8)	0,515
Monoinsaturado (g)¹	51,4 (±42,2)	39,3 (±21,2)	53,2 (±33,6)	56,6 (±49,6)	57,4 (±43,4)	48,8 (±45,3)	0,669
18:2 n-6 (g)	24,5 (±21,2)	21,2 (±19,1)	26,1 (±23,7)	26,5 (±24,1)	26,8 (±21,4)	22,7 (±18,1)	0,834
18:3 n-3 (g)	3,5 (±2,5)	3,5 (±2,7)	3,7 (±2,8)	3,5 (±2,7)	3,9 (±2,7)	3,2 (±2,2)	0,763
20:4 n-6 (g) ⁴	0,3 (±0,3) ^{a,b}	0,2 (±0,1) ^{a,b}	0,4 (±0,5) ^a	0,3 (±0,3) ^{a,b}	0,3 (±0,4) ^{a,b}	0,2 (±0,2) ^b	0,157
20:5 n-3 (g)	0,07 (±0,1)	0,04 (±0,1)	0,10 (±0,2)	0,05 (±0,1)	0,11 (±0,3)	0,06 (±0,1)	0,306
22:5 n-3 (g)	0,02 (±0,02)	0,01 (±0,01)	0,03 (±0,02)	0,01 (±0,02)	0,02 (±0,03)	0,02 (±0,01)	0,132
22:6 n-3 (g)	0,1 (±0,2)	0,1 (±0,1)	0,2 (±0,4)	0,1 (±0,2)	0,2 (±0,5)	0,1 (±0,2)	0,228
Razão n-6/n-3 ⁵	7,0 (±1,9) ^{a,b}	6,1 (±1,3) ^a	6,8 (±1,6) ^{a,b}	7,5 (±2,2) ^{a,b}	6,9 (±1,4) ^{a,b}	7,0 (±1,8) ^b	0,041
Polinsaturado (g)	28,6 (±23,8)	25,0 (±21,8)	30,7 (±27,4)	30,5 (±26,8)	31,5 (±24,0)	26,5 (±20,4)	0,821

* Regressão Linear Múltipla (GLM) com correção de *Bonferroni* entre os grupos e o consumo, ajustes: cor da pele, idade e escolaridade materna e peso pré-gestacional.

Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas nas comparações múltiplas: AG 20:4: GHAS^a diferente de GCON^b. Razão n-6/n-3: GDM^a diferente de GCON^b.

¹ Significativo para idade e escolaridade materna. ² Escolaridade materna. ³ Idade materna. ⁴ Grupo HAS x controle. ⁵ Grupo DM x controle, cor da pele e idade materna.

7.1.3 Peso ao Nascer

A média (\pm DP) do peso dos RNs em geral foi de 3168,2g (\pm 457,0), variando de 2235g a 4560g. Quinze (8,3%) RNs apresentaram baixo peso.

A Tabela 4 representa a relação do peso ao nascer entre os diferentes grupos e o consumo de AG PUFAs entre as gestantes. Observou-se que o peso ao nascer foi diferente em relação aos grupos GTAB (variação de $p=0,009$ a $p=0,011$) e GRCIU ($p<0,001$) e foi influenciado pelo peso pré-gestacional ($p=0,001$) na análise com AG PUFAs.

Não se observou diferença qualquer entre consumo de macronutrientes das gestantes e crescimento intrauterino, determinado pelo peso dos RNs. O consumo de AG 20:4 n-6 foi limítrofe (*boderline*) para a associação com menor peso ao nascer ($p=0,053$) na análise pré-ajustes, perdendo significância após, com os ajustes realizados ($p=0,420$).

Tabela 4 - Coeficiente Beta do peso ao nascer entre os diferentes grupos e a associação do consumo de AG PUFAs entre as gestantes. (Coorte IVAPSA, Porto Alegre, Setembro-2011 a Julho-2013).

Grupos (n=170)	GDM (n=24)		GHAS (n=20)		GTAB (n=52)		GRCIU (n=20)		Total
Consumo Alimentar PUFAs	Coeficiente B (IC 95%)	p valor*	Coeficiente B (IC 95%)	p valor*	Coeficiente B (IC95%)	p valor*	Coeficiente B (IC 95%)	p valor*	p valor*
18:2 n-6 (g) ¹	-1,8 (-6,9 - 3,2)	0,482	0,9 (-4,5-6,3)	0,743	-0,2 (-3,8-3,5)	0,923	-0,1 (-5,2-4,9)	0,965	0,784
18:3 n-3 (g) ¹	-14,1 (-53,4 -25,2)	0,482	12,9 (-31,3-57,2)	0,567	-8,7 (-40,1-22,7)	0,586	-1,2 (-41,8-39,4)	0,955	0,546
20:4 n-6 (g) ¹	-175,62 (-677,2 - 325,9)	0,493	-177,5 (-531,6-176,5)	0,336	-31,2 (-343,8-281,4)	0,845	-93,5 (-515,8-328,9)	0,664	0,420
20:5 n-3 (g) ¹	-377,13 (-1421,2- 666,9)	0,479	-131,0 (-968,1-706,1)	0,759	-372,0 (-1188,7-444,8)	0,372	-50,9 (-619,9-518,1)	0,861	0,789
22:5 n-3 (g) ¹	-2094,1 (-7701,7-3513,5)	0,464	-2274,0 (-7086,6-2538,7)	0,354	-1080,1 (-5217,2-3057,1)	0,609	-406,1 (-4201,3-3389,1)	0,834	0,412
22:6 n-3 (g) ¹	-296,6 (-965,8-372,7)	0,385	-84,0 (-520,5-352,4)	0,706	-309,6 (-813,6-194,4)	0,229	-27,1 (-337,4-283,3)	0,864	0,740
Razão n-6/n-3 ¹	-4,84 (-65,9-56,2)	0,877	-10,8 (-77,8-56,2)	0,752	9,9 (-32,2-52,0)	0,664	1,3 (-58,1-60,7)	0,966	0,729
Poliinsaturado (g)¹	-1,62 (-6,1-2,8)	0,476	0,8 (-4,0-5,5)	0,745	-0,3 (-3,6-3,0)	0,867	-0,1 (-4,6-4,4)	0,951	0,745

* Regressão Linear Múltipla (GLM) com correção de *Bonferroni*, ajustes: sexo, idade e escolaridade materna e peso pré-gestacional (grupos x controle e total).

¹ Significativo para peso pré-gestacional.

7.2 PARTE EXPERIMENTAL

7.2.1 Ganho de Peso e Consumo Alimentar

Os animais do GSM apresentaram aumento do peso corporal no DPN 21 (GNM: $36,09 \pm 1,08$; GSM: $40,07 \pm 0,96$), DPN 28 (GNM: $65,60 \pm 1,71$; GSM: $70,92 \pm 1,43$) e DPN 35 (GNM: $105,90 \pm 2,30$; GSM: $112,81 \pm 1,83$), ante às dietas adequada ou deficiente em n-3 PUFAs (t de *student*; $t(60)=2,742$ e $p=0,008$; $t(60)=2,366$ e $p=0,021$ e $t(60)=2,327$ e $p=0,023$, respectivamente). Houve efeito do grupo, em que os ratos separados (GSM) ganharam mais peso [ANOVA de medidas repetidas; $F(1,58)=6,719$ e $p=0,012$] e consumiram mais ração [$F(1,25)=4,345$ e $p=0,047$] em comparação ao GNM, sem interação entre eles [$F(1,58)=0,009$ e $p=0,926$ para o peso, $F(1,25)=0,273$ e $p=0,606$ para o consumo alimentar]. É importante destacar que em relação aos parâmetros do nosso ratário, o peso corporal médio de 5 meses de idade de ratos *Wistar* alimentados com dieta padrão deve atingir entre 330g e 370g. Não se observou diferença entre os grupos de dietas (adequada ou deficiente) no peso corporal [$F(1,58)=2,815$ e $p=0,099$] ou consumo alimentar [$F(1,25)=1,418$ e $p=0,245$]. A Figura 1 e a Figura 2 mostram os resultados, respectivamente.

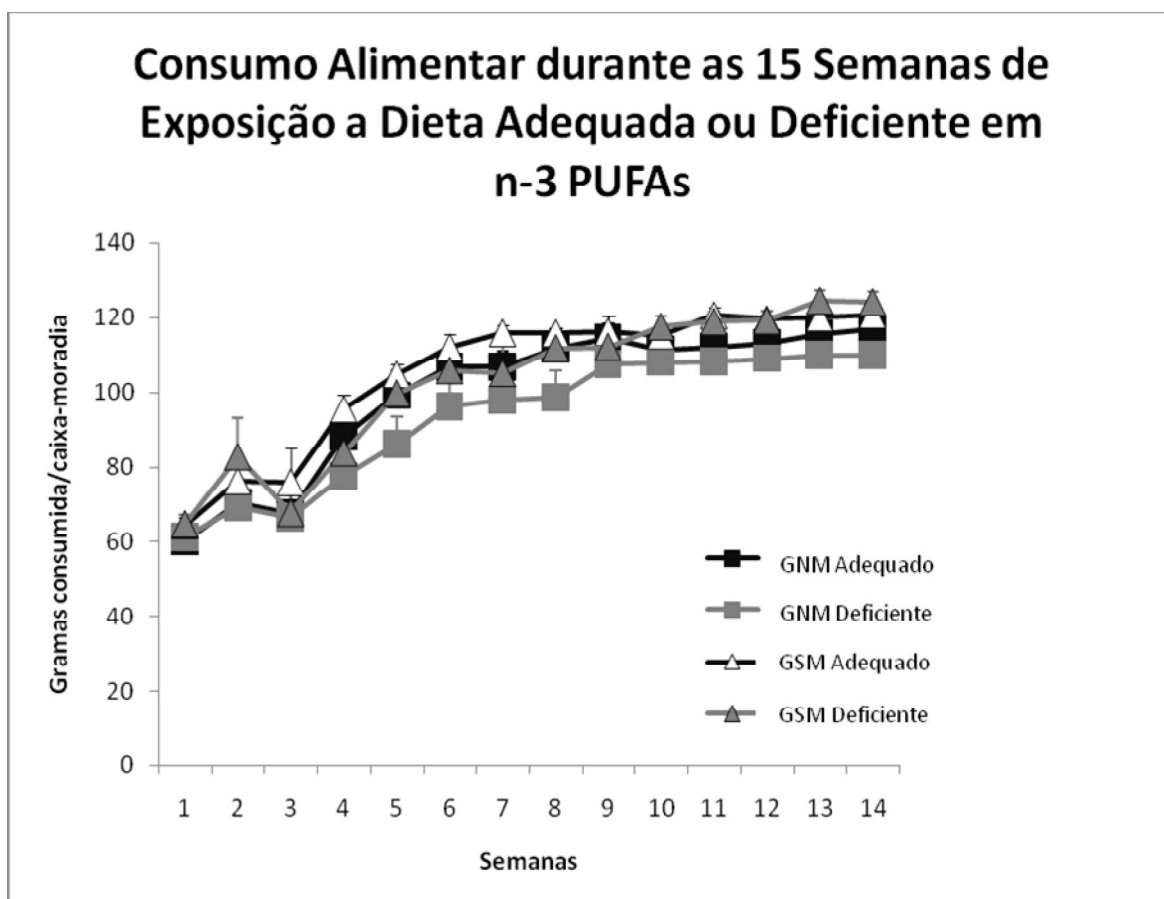


Figura 1 - Média \pm (SEM) do consumo alimentar semanal (por caixa-moradia) durante as 15 semanas de exposição crônica às dietas (desde DPN 35). Animais separados (GSM) apresentaram aumento do consumo de alimentos em comparação com o grupo não-manipulado (GNM) (ANOVA de medidas repetidas; $p=0,047$). Não houve efeito das dietas sobre o consumo alimentar ($p=0,245$), ou interação entre eles (GSM_adequado = 6 caixas; GSM_deficiente = 6 caixas; GNM_adequado = 7 caixas; GNM_deficiente = 10 caixas).

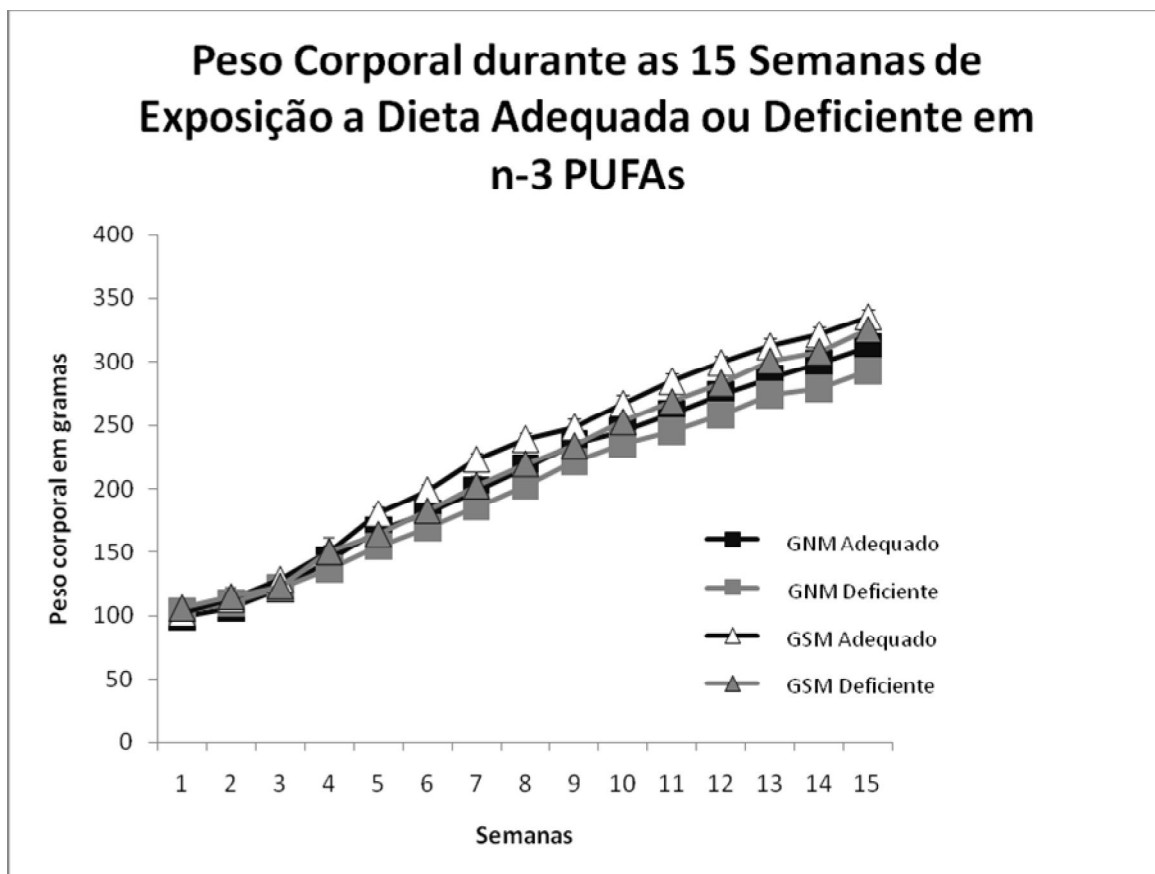


Figura 2 - Média \pm (SEM) do peso corporal semanal durante as 15 semanas de exposição crônica às dietas (desde DPN 35). Animais separados (GSM) apresentaram aumento do peso corporal em comparação com o grupo não-manipulado (GNM) (ANOVA de medidas repetidas; $p=0,012$). Não houve efeito da dietas sobre o peso corporal ($p=0,099$), ou interação entre eles.

7.2.2 Gordura Abdominal

A deposição de gordura abdominal foi expressa em porcentagem do peso corporal de cada rato. O GSM apresentou maior deposição de gordura abdominal [ANOVA de duas vias, $F(1,61)=35,378$, $p<0,001$] em comparação ao GNM, sem efeito das dietas [$F(1,61)=0,097$ e $p=0,756$] ou interação [$F(1,61)=0,327$ e $p=0,570$]. Os resultados estão demonstrados na Figura 3.

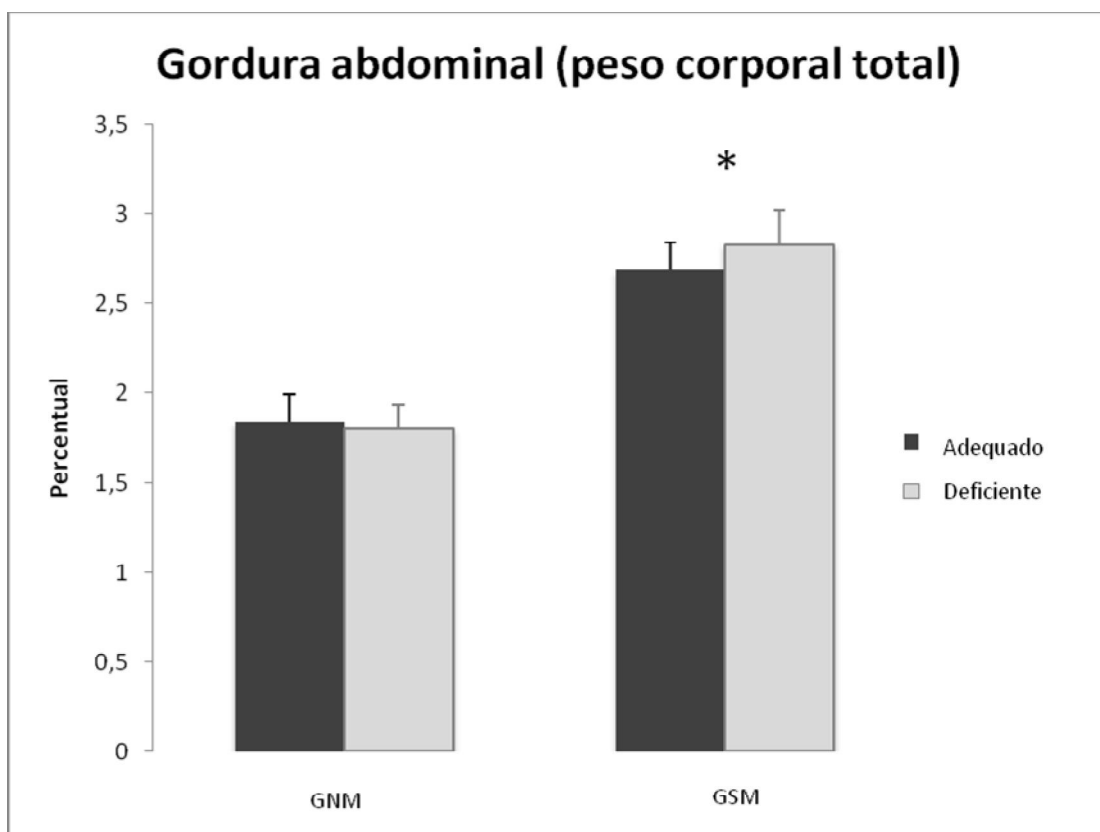


Figura 3 - Gordura abdominal [(soma dos depósitos renais e gonadais em gramas) * 100 / peso corporal total em gramas]. Animais separados (GSM) apresentaram aumento da gordura abdominal em comparação ao grupo não-manipulado (GNM) (ANOVA de duas vias; $p < 0,001$), sem efeito das dietas ($p = 0,756$) ou interação entre eles.

7.2.3 Análises Bioquímicas

Os resultados das medições bioquímicas estão indicados na Tabela 2. O GSM apresentou níveis aumentados de TG plasmático [ANOVA de duas vias; $F(1,29) = 6,403$ e $p = 0,018$], quando comparado com o GNM, sem efeito da dieta [$F(1,29) = 0,707$ e $p = 0,408$] ou interação [$F(1,29) = 1,212$ e $p = 0,281$]. Não houve diferença na glicose plasmática [$F(1,29) = 1,071$ e $p = 0,310$], colesterol total [$F(1,29) = 2,142$ e $p = 0,155$], LDL [$F(1,28) = 3,731$ e $p = 0,065$] e HDL [$F(1,28) = 0,022$ e $p = 0,882$] entre os grupos e nenhum efeito da dieta [$F(1,29) = 0,473$ e $p = 0,497$, $F(1,29) = 2,895$ e $p = 0,101$, $F(1,28) = 0,768$ e $p = 0,389$ e $F(1,28) = 0,008$ e $p = 0,931$, respectivamente] ou interação [$F(1,29) = 0,151$ e

$p=0,701$; $F(1,29)=0,686$ e $p=0,415$, $F(1,28)=0,024$ e $p=0,878$ e $F(1,28)=0,011$ e $p=0,917$, respectivamente].

Houve interação entre o GSM e a exposição da dieta deficiente nos níveis séricos de insulina [$F(1,29)=5,083$ e $p=0,033$], em que os ratos separados e deficientes foram estatisticamente diferentes dos separados adequados (LSD *post hoc*; $p=0,013$) e não-manipulados deficientes ($p=0,022$), enquanto que a diferença para o GNM adequado não alcançou significância estatística ($p=0,078$). Interação foi também observada para o índice de HOMA [$F(1,29)=4,276$ e $p=0,049$], em que o padrão foi semelhante ($p=0,023$, $p=0,022$ e $p=0,075$ para a diferença entre separados deficientes, separados adequados, não-manipulados deficientes e não-manipulados adequados). Não houve efeito isolado entre os grupos [$F(1,29)=1,143$ e $p=0,295$ para insulina; $F(1,29)=1,619$ e $p=0,214$ para índice de HOMA] ou dieta [$F(1,29)=2,320$ e $p=0,140$ para insulina; $F(1,29)=1,816$ e $p=0,189$ para índice de HOMA].

Os níveis de leptina sérica [$F(1,28)=7,840$ e $p=0,010$] também demonstraram interação, em que os animais separados deficientes apresentaram diferença em comparação aos não-manipulados adequados (LSD *post hoc*; $p=0,037$) e não-manipulados deficientes ($p=0,001$), enquanto que a diferença para os separados adequados não alcançou significância estatística ($p=0,160$). A expressão do gene da PEPCK no fígado seguiu o mesmo padrão de interação [$F(1,24)=4,239$ e $p=0,050$], mas as comparações múltiplas não foram capazes de detectar as diferenças. Não houve efeitos isolados de dieta [$F(1,28)=0,202$ e $p=0,657$ para a leptina e $F(1,24)=0,114$ e $p=0,739$ para o PEPCK] entre os desfechos, porém enquanto nenhum efeito isolado do grupo foi encontrado para PEPCK [$F(1,24)=0,509$ e $p=0,484$], efeito do grupo sobre os níveis de leptina foi encontrado [$F(1,28)=16,175$ e $p<0,001$], que desapareceu após o ajuste da ANOVA para a gordura abdominal (% do peso corporal), enquanto que a

interação grupo x dieta permaneceu significativo [F(1,28)=0,923 e p=0,346 para o grupo; F(1,28)=0,558 e p=0,462 para a dieta e F(1,28)=5,416 e p=0,029 para a interação].

O conteúdo de NPY do hipotálamo também não foi diferente entre os grupos [F(1,24)=0,288 e p=0,597], dietas [F(1,24)=0,022 e p=0,884] ou interações [F(1,24)=0,433 e p=0,518].

Estes resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Medições bioquímicas (média \pm SEM).

Dietas	GNM		GSM	
	Adequada	Deficiente	Adequada	Deficiente
	n=7	n=8	n=7	n=8
Glicose (mg%)	100,7 \pm 4,5	99,5 \pm 4,0	106,5 \pm 4,2	102,1 \pm 3,6
Colesterol total (mg%)	60,9 \pm 1,8	63,3 \pm 2,9	54,8 \pm 2,0	61,6 \pm 3,2
HDL (mg/dl)	25,5 \pm 1,5	24,7 \pm 2,6	24,6 \pm 3,5	24,6 \pm 4,8
LDL (mg/dl)	21,5 \pm 2,8	26,1 \pm 3,7	13,8 \pm 2,4	16,9 \pm 6,5
Triglicérides (%mg)*	69,6 \pm 5,2	67,2 \pm 5,8	82,5 \pm 11,3	99,9 \pm 11,5
Insulina (ng/mL)**	1,8 \pm 0,1 ^{a,b}	1,6 \pm 0,2 ^b	1,4 \pm 0,3 ^b	2,6 \pm 0,5 ^a
Leptina (pg/mL)**	2442,6 \pm 379,4 ^b	1445,1 \pm 115,8 ^b	2819,1 \pm 265,2 ^{a,b}	3541,4 \pm 365,8 ^a
Índice de HOMA**	0,5 \pm 0,1 ^{a,b}	0,4 \pm 0,1 ^b	0,4 \pm 0,1 ^b	0,7 \pm 0,1 ^a
PEPCK mRNA fígado	100,0 \pm 9,0	78,9 \pm 9,0	75,7 \pm 9,8	89,5 \pm 7,8
(% valores RQ em relação ao grupo não manipulado adequado)**				
NPY do Hipotálamo (ng/mg)	1,5 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3	1,6 \pm 0,1

Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas nas comparações múltiplas (teste LSD teste). RQ = *Relative quantification*.

* ANOVA de duas vias: Efeito da Separação Materna, p \leq 0,05

** ANOVA de duas vias: Interação da Separação Materna e Dieta, p \leq 0,05

7.2.4. Determinação dos Ácidos Graxos no Sangue Periférico

Houve interação entre o GSM e a dieta nos níveis periféricos de AG 16:1 n-7 [F(1,16)=5,703, p=0,030], em que animais deficientes separados apresentaram níveis

maiores em comparação aos deficientes não-manipulados (*post hoc* LSD, $p=0,034$). Não foram observados efeitos isolados de grupo [$F(1,16)=0,802$, $p=0,384$], ou dieta [$F(1,16)=0,003$, $p=0,957$], para este AG.

Outra interação foi também observada nos níveis periféricos de AG 18:3 n-3 [$F(1,16)=5,828$ e $p=0,028$], em que animais deficientes não-manipulados apresentaram valores diminuídos, quando comparado com os níveis dos adequados não-manipulados (*post hoc* LSD; $p=0,007$), mas também quando comparado com os animais separados deficientes (*post hoc* LSD; $p=0,044$), as comparações para os animais não-manipulados adequados não foram significativas. Não foram observados efeitos isolados de grupo [$F(1,16)=0,450$ e $p=0,512$], ou dieta [$F(1,16)=3,664$ e $p=0,074$], para este AG.

Efeito isolado da dieta foi verificado nos níveis periféricos de AG 22:6 n-3 (DHA) [$F(1,16)=5,161$ e $p=0,037$], na soma de AG saturados [$F(1,16)=4,594$ e $p=0,048$] e no conteúdo total de n-6 PUFA's [$F(1,16)=14,707$ e $p=0,001$], em que os animais que receberam a dieta deficiente apresentaram níveis aumentados de DHA periférico e n-6 PUFA's e diminuídos de AG saturado. Não foram observados efeitos isolados do grupo para DHA [$F(1,16)=0,980$ e $p=0,337$], AG saturado [$F(1,16)=1,000$ e $p=0,332$] ou n-6 PUFA's [$F(1,16)=0,617$ e $p=0,443$]; ou interação para DHA [$F(1,16)=1,328$ e $p=0,266$], AG saturado [$F(1,16)=1,612$ e $p=0,222$] e n-6 PUFA's [$F(1,16)=0,000$ e $p=0,999$]. Todavia, não foram observadas diferenças no total de AG n-3 PUFA's [$F(1,16)=0,111$ e $p=0,744$ para o grupo, $F(1,16)=0,782$ e $p=0,390$ para a dieta e $F(1,16)=0,385$ e $p=0,544$ para a interação] ou no Índice ômega-3 (EPA + DHA) [$F(1,16)=0,537$ e $p=0,537$ para grupo, $F(1,16)=0,245$ e $p=0,627$ para a dieta e $F(1,16)=0,270$ e $p=0,871$ para a interação] entre os grupos.

Nenhuma outra diferença ou efeito isolado foi observado no perfil de AG no sangue periférico (Tabela 3). Entretanto, houve correlações negativas entre os níveis

periféricos de AG 18:0 (esteárico) e o índice de HOMA ($r=-0,553$ e $p=0,014$), a insulina ($r=-0,920$ e $p=0,027$) e os níveis de triglicérides ($r=-0,580$ e $p=0,009$). Além disso, os níveis periféricos de AG 16:1 n-7 (palmitoléico) correlacionaram-se positivamente com a deposição de gordura abdominal (percentagem do peso corporal) ($r=0,486$ e $p=0,035$).

Tabela 3 - Composição dos ácidos graxos do sangue periférico do grupo separado e não-manipulado submetido à dieta adequada ou deficiente em n-3 PUFAs.

Dieta	GNM		GSM		Valor de p		
	Adequada (mg/100mg ácido graxo)	Deficiente (mg/100mg ácido graxo)	Adequada (mg/100mg ácido graxo)	Deficiente (mg/100mg ácido graxo)	Grupo	Dieta	Interação
12:0	0,5 ± 0,6	0,4 ± 0,4	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,7	0,060	0,539	0,788
14:0	0,8 ± 0,6	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,563	0,388	0,474
16:0	24,2 ± 2,1	25,0 ± 0,3	24,2 ± 2,0	23,1 ± 1,4	0,209	0,846	0,181
16:1 n-7	0,4 ± 0,5 ^{a,b}	0,0 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,3 ^{a,b}	0,6 ± 0,6 ^a	0,384	0,957	0,030
17:0	0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,369	0,369	0,640
18:0	18,3 ± 2,2	18,2 ± 0,9	19,1 ± 1,7	16,8 ± 2,5	0,708	0,178	0,210
18:1 n-9	13,9 ± 2,0	14,0 ± 0,6	15,2 ± 1,7	16,3 ± 3,1	0,063	0,527	0,551
18:1 n-7	1,7 ± 0,5	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,4	2,2 ± 0,3	0,213	0,142	0,713
18:2 n-6	11,1 ± 1,6	11,7 ± 1,6	11,3 ± 1,5	13,6 ± 2,5	0,206	0,092	0,311
20:1 n-9	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,620	0,164	0,894
18:3 n-3	0,8 ± 0,3 ^b	0,1 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,4 ^{a,b}	0,6 ± 0,5 ^b	0,512	0,074	0,028
22:0	0,7 ± 0,7	0,2 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,723	0,375	0,404
20:3 n-6	1,0 ± 0,8	1,2 ± 0,8	0,7 ± 0,7	0,7 ± 0,7	0,261	0,759	0,791
20:3 n-3	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,975	0,264	0,431
20:4 n-6	11,8 ± 1,0	13,9 ± 1,4	11,3 ± 2,1	11,8 ± 3,0	0,174	0,172	0,405
24:0	3,8 ± 1,9	2,6 ± 1,7	3,3 ± 1,9	2,9 ± 1,8	0,906	0,352	0,620
20:5 n-3	1,2 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,7 ± 1,0	0,6 ± 0,9	0,909	0,075	0,112
24:1 n-9	3,7 ± 1,2	3,3 ± 0,4	3,5 ± 1,0	2,7 ± 1,4	0,397	0,173	0,723
22:5 n-3	1,7 ± 0,4	1,0 ± 0,7	1,5 ± 0,9	1,1 ± 0,8	0,935	0,099	0,605
22:6 n-3	2,7 ± 0,6 ^a	4,1 ± 1,6 ^b	2,8 ± 0,4 ^a	3,2 ± 0,0 ^b	0,337	0,037	0,266
Saturado	48,5 ± 3,5 ^a	47,4 ± 1,2 ^b	48,8 ± 2,7 ^a	44,7 ± 2,8 ^b	0,332	0,048	0,222
Monoinsaturado	20,0 ± 2,4	19,5 ± 0,8	20,8 ± 1,1	22,0 ± 2,7	0,065	0,680	0,335
n-3 PUFAs	6,7 ± 1,4	5,4 ± 2,0	5,8 ± 2,0	5,6 ± 2,2	0,744	0,390	0,544
n-6 PUFAs	23,9 ± 1,9 ^a	26,8 ± 0,9 ^b	23,4 ± 2,2 ^a	26,2 ± 1,4 ^b	0,443	0,001	0,999
Razão n-6/n-3	3,7 ± 0,6	5,6 ± 2,0	4,5 ± 1,9	5,4 ± 2,4	0,734	0,112	0,576

8. DISCUSSÃO

8.1 PARTE CLÍNICA

A coorte do estudo clínico encontra-se em andamento e tem o objetivo principal de acompanhar o par mãe-RN desde o pós-parto até os seis meses de vida do lactente. Trata-se do primeiro estudo longitudinal temático focado em avaliar os desfechos materno-infantis entre mães de diferentes condições clínicas (Bernardi *et al.*, 2012). Dessa forma, é importante ressaltar que se torna difícil a comparação dos resultados encontrados com aqueles de estudos de outras coortes de RNs.

Observou-se que a amostra da coorte IVAPSA constituiu-se de mães com média de idade aproximadamente de 26,5 anos, possuindo 9 anos de escolaridade, sendo em sua maioria da cor da pele branca e das classes socioeconômicas familiares B2, C1 e C2. Em relação à idade materna, a média foi maior no GHAS, em comparação ao GTAB e GRCIU. Assim, evidenciou-se que a idade das mães foi superior às coortes de Ribeirão Preto de 1978 (25,6 anos) e 1994 (25,7 anos) (Goldani *et al.*, 2000), seguindo a tendência de aumento da idade materna na população (Hernandez *et al.*, 2011).

Em relação às características antropométricas, observou-se maior média de peso pré-gestacional e maior ganho de peso gestacional no GHAS. Confirmando a associação das duas condições clínicas: coorte denominada ALSPAC (*Avon Longitudinal Study of Parents and Children*) com 12.522 mulheres encontrou que maior peso pré-gestacional esteve associado com maior risco de hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia (Macdonald-Wallis *et al.*, 2013). Além disso, outra coorte realizada em Portugal com 6952 mulheres encontrou associação de distúrbios hipertensivos na gestação com excesso de peso antes e durante a gestação (Alves *et al.*, 2013).

Sobre as variáveis antropométricas infantis, os valores de peso do RN, comprimento ao nascer e perímetro cefálico foram significativamente diferentes entre os grupos (valores inferiores no GRCIU). As diferenças encontradas confirmam a adequada seleção dos grupos de conveniência da coorte.

A partir dos resultados do consumo retrospectivo das gestantes, encontrou-se que o AG AA foi superior no GHAS, por outro lado, a razão entre n-6 e n-3 foi inferior no GDM. Entretanto, não houve associação com os demais nutrientes analisados entre as mães dos diferentes grupos.

Sabe-se que o ácido araquidônico (AA) da série n-6 é convertido em mediadores eicosanóides por três grupos de enzimas distintas: cicloxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) ou citocromo P450 monoxigenases (CYP). Por sua vez, a via do CYP produz dois tipos de eicosanóides: ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) formados pela CYP epoxigenases e ácidos hidroxieicosatetraenoico (HETEs) formados pela CYP ômega-oxidases (Brash, 2001). Tais produtos foram inicialmente caracterizados por suas funções vasoativas na fisiopatologia da hipertensão experimental, angiogênese e desenvolvimento de inflamação (Bogatcheva *et al.*, 2005). Além disso, alguns estudos indicam que os metabólitos da via CYP do AA podem desempenhar papel no desenvolvimento de glomeruloesclerose em estados de doença tais como hipertensão, diabetes e lesões autoimunes (Muthalif *et al.*, 1998; Uddin *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999).

Estudo recente realizado com homens japoneses encontrou que a inadequação dietética de AG de cadeia longa (mensurado pelo nível sérico baixo da razão EPA/AA) esteve correlacionada com acumulação de gordura visceral nos indivíduos (Inoue *et al.*, 2013). Sobre o papel do AA na vida precoce, estudo holandês mostrou associação negativa significativa entre o AA plasmático e o peso do RN e comprimento ao nascer

(Dirix *et al.*, 2009). Além disso, outro estudo demonstrou, após os ajustes para fatores de estilo de vida e sociodemográficos, que altas concentrações de AA mantiveram-se associados com menor peso ao nascer, maior risco de baixo peso ou ambos os fatores (van Eijdsden *et al.*, 2008). No entanto, os resultados encontrados neste estudo não permitem afirmar que o maior consumo de AA tenha ocasionado hipertensão nas gestantes, em função da complexidade dos fatores de risco envolvidos com a doença (Alves *et al.*, 2013), além do desconhecimento do início da hipertensão materna. Sabe-se que as principais fontes de ômega-6 são: óleos vegetais (principalmente milho e soja) e carnes (principalmente frango) (Martin *et al.*, 2006). Artigo com o objetivo de descrever os dados da POF (Pesquisa de Orçamento Familiar) 2008-2009 observou excesso de açúcares livres e de gorduras em todas as regiões, especialmente nas Sul e Sudeste, além da proporção de AG saturados ser elevada no meio urbano e consistente com a maior participação de produtos de origem animal (Levy *et al.*, 2012). Assim, sugere-se que o maior consumo do AG AA possa ser um marcador do estilo de vida dessas gestantes, refletindo em pior qualidade da dieta (não mensurada nestas análises). Porém, neste estudo, maior consumo de AA não esteve relacionado com o peso ao nascer.

Sabe-se que os AG das famílias n-6 e n-3 competem entre si pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia, assim, a adequada razão entre a ingestão diária de alimentos fontes assume importância no contexto da nutrição (Emken *et al.*, 1994). Artigos de revisão evidenciam a tendência de convergência da razão entre os AG n-6 e n-3 para o intervalo de 4:1 a 5:1, porém as razões entre 2:1 a 3:1 têm sido recomendadas por alguns autores. Por outro lado, dietas baseadas em razões entre n-6 e n-3 inferiores a 1:1 não são recomendadas, como também razões superiores a 10:1, devido a consequências adversas à saúde (Martin *et*

al., 2006; Simopoulos, 2008). Sabe-se que a dieta ocidental pode chegar a razão n-6 e n-3 elevada, como 30:1 (Simopoulos, 2008). Assim, para a promoção de saúde geral, essa razão deveria ser mais baixa que a da dieta ocidental. Alguns especialistas advogam diminuir essa relação por meio tanto do aumento do consumo de n-3 como também pela redução de n-6 (Santos *et al.*, 2013). Dessa forma, o fato do GDM ter razão n-6/n-3 inferior ao GCON pode estar relacionado ao fato das puérperas relatarem maior orientação nutricional durante a gestação (76%) em comparação aos outros grupos (GRCIU: 66,7%; GHAS: 55%), apesar de não possuir diferença estatística ($p=0,171$) entre eles.

Nesse estudo, não foram encontradas diferenças do consumo alimentar das gestantes com os demais nutrientes entre os grupos. A hipótese de que indivíduos expostos ao tabagismo possuem maior preferência alimentar por carboidratos (Ayres *et al.*, 2011) não foi explicada pelo maior consumo de carboidrato na gestação.

Ressalta-se que o consumo de nutrientes avaliados não apresentou associação com o desfecho peso ao nascer, trazendo a dificuldade que é mensurar de forma direta essas associações, porém, efeitos na parte metabólica ou a longo prazo deverão ser investigados nas crianças para conclusões mais precisas do efeito do consumo alimentar materno.

Corroborando com o resultado, estudo com o objetivo de determinar a associação entre o consumo de frutos do mar em mulheres e o crescimento fetal não encontrou diferença estatisticamente entre eles. Entretanto, nas mulheres com sobrepeso, o maior consumo de frutos do mar antes da gestação esteve associada a maior circunferência biparietal fetal e circunferência abdominal e medidas antropométricas infantis. Do menor para o maior tercil de consumo, a média do peso ao nascer foi 167g maior (Drouillet *et al.*, 2009). Porém, estudo clássico realizado com o

objetivo de explorar se o consumo materno de frutos do mar é um determinante do peso ao nascer encontrou que as crianças cujas mães consumiram três ou mais refeições dos alimentos por semana apresentaram maior média ponderada de peso ao nascer superior (200 gramas), quando comparado às crianças cujas mães não consumiram frutos do mar (Olsen *et al.*, 1993). Outro estudo dinamarquês realizado com mais de 8.000 mulheres também constatou que crianças cujas mães consumiram peixe durante a gestação apresentaram peso maior em relação às mães que não consumiam o alimento. Além disso, encontrou-se que o risco de parto prematuro e de baixo peso ao nascer aumentou nas mulheres que consumiam pouco ou não consumiam peixe (Olsen & Secher, 2002). Assim, sugere-se que uma série de confundidores (exposoma) diferentes podem influenciar os resultados de consumo alimentar materno e desfechos nas crianças, ocasionando a inconsistência dos resultados dos estudos (Mathers, 2007).

Neste estudo, observou-se também que o peso pré-gestacional, mediador nesse processo, influenciou o peso ao nascer em todos os nutrientes analisados. Sugere-se que o peso pré-gestacional, mesmo estando relacionado com o ganho de peso gestacional, seja um preditor independente nas associações do peso ao nascer, ao contrário do ganho de peso proporcional calculado. Assim, para esta amostra, a herança biológica da mãe teria maior influência nas condições de saúde da criança do que a plasticidade gestacional. Coorte realizada com mais de 100 mil nascimentos entre 2000 a 2005 encontrou que o IMC pré-gestacional modificou a relação ganho de peso e maior peso ao nascer (Dietz *et al.*, 2009).

Dentre as limitações do estudo, aponta-se que o consumo alimentar das gestantes foi avaliado retrospectivamente por meio da aplicação do QFA, o que pode ter provocado o viés de recordação (viés de aferição) e a causalidade reversa. Por se tratar de um questionário semiquantitativo, o QFA utilizado pode ter contribuído para a

superestimação na quantidade consumida de cada um dos alimentos investigados, em comparação a instrumentos como o Recordatório 24 horas (Giacomello *et al.*, 2008). No entanto, houveram treinamentos específicos com os entrevistadores e observações importantes no questionário, como estratégias para melhorar o desempenho do instrumento. Além disso, ao se retirar da amostra as mães com o consumo superior a 10.000Kcal, não houve modificação significativa dos resultados encontrados. Por se tratar de um estudo de seguimento partindo de uma entrevista realizada no pós-parto, o instrumento escolhido foi o QFA, pois ele mensura o consumo alimentar em períodos longos de tempo, e sua execução e a análise dos resultados, são fáceis e rápidas, quando comparado a instrumentos como registros ou recordatórios. As vantagens na aplicação do instrumento traduzem em baixo custo, importante fator em estudos epidemiológicos (Zulkifli & Yu, 1992; Fisberg *et al.*, 2005).

Outra limitação importante foi o fato da informação sobre o peso pré-gestacional ser obtida por meio do relato das puérperas. Entretanto, evidencia-se na literatura que muitos autores utilizam essa informação de maneira auto-relatada (Jensen *et al.*, 2005; Kac & Velasquez-Melendez, 2005) pela alta correlação encontrada entre o peso referido pela gestante e o mensurado ($r=0,99$) (Kleinman *et al.*, 2007).

Para investigar o impacto de exposições precoces e os efeitos ao longo da vida em diferentes contextos clínicos, o delineamento escolhido deste estudo foi o de coorte múltipla prospectiva controlada, com base em uma amostra de conveniência de RNs, pois se evidencia que os desfechos estudados possuem diferentes taxas em gestantes. Em estudos realizados no Brasil encontram-se, por exemplo, prevalência de HAS em gestantes em São Paulo de 13,9% (Chaim *et al.*, 2008); hiperglicemia gestacional em 6 capitais do Brasil de 7,6% (Schmidt *et al.*, 2000); fumantes ativas durante a gestação de 23% em Porto Alegre (Galão *et al.*, 2009) e 18,0% em Ribeirão Preto e 18,5% em

Maranhão de bebês com RCIU (De Farias Aragao *et al.*, 2005), independente da causa, pela classificação de Kramer *et al.*, (Kramer *et al.*, 2001). Entretanto, a capacidade de generalização dos resultados fica limitada, em função dos grupos terem condições concomitantes.

Esse estudo inaugurou ainda de forma preliminar a fase de análises da coorte IVAPSA. A partir do desenho original, a IVAPSA busca investigar a influência dos diversos fatores ambientais e constitucionais sobre os desfechos ao longo do ciclo vital de indivíduos submetidos a diferentes padrões de estresse. Os resultados preliminares apontam para as dificuldades de identificar possíveis relações de causalidade considerando questões temporais (duração e janelas), intensidade e direção. Essa crise das hipóteses advindas do DOHaD emana da crítica constituída sobre o seu teor determinístico em disputa com influências ofertadas pela história materna, rica em eventos aleatórios e pelo futuro dessa geração de RN. Assim, o desafio e objetivo constituem-se em conduzir esse estudo sobre o tênue limite entre a dúvida do estado da arte e a incerteza dos nossos resultados, evitando colocar em evidência achados ocasionais. Enfim, avançado para além dos objetivos do estudo temos a intenção de continuar com a responsabilidade de fazer uma ciência comprometida.

8.2 PARTE EXPERIMENTAL

A partir dos resultados da parte experimental, encontrou-se que o estresse, medido por meio da separação materna, esteve associado ao ganho de peso, consumo alimentar, gordura abdominal e TG plasmático em ratos adultos. Além disso, a exposição crônica a deficiência dietética de n-3 PUFAs potencializou a vulnerabilidade conferida pelo estresse neonatal, conduzindo a alterações na resistência insulínica e a leptina, assim como alterações específicas no perfil de AG periféricos.

Dessa forma, os resultados deste estudo mostraram que o estresse pela separação materna está associado com maior peso corporal, o qual pode ser detectado ao desmame (antes da exposição à deficiência dietética em n-3 PUFAs), bem como no aumento da ingestão alimentar e gordura abdominal, independentemente do tratamento dietético. É interessante notar que o padrão de ingestão alimentar a partir da semana 1 a 3 é irregular em todos os grupos pelo aumento da ingestão alimentar súbita durante a segunda semana de exposição à dieta. Outros dados têm mostrado semelhante irregularidade durante as primeiras medições do consumo alimentar quando há alteração no tipo de dieta e/ou no teor de gordura (Lucas *et al.*, 1989) e isto é possivelmente relacionado com a adaptação dos filhotes para a nova alimentação.

Em relação ao modelo de intervenção precoce, os estudos sugerem que a separação materna neonatal possa levar ao desenvolvimento de desordens alimentares, especialmente quando o animal é desafiado com outros estressores sociais ou metabólicos ao longo da vida (Jahng, 2011). O balanço energético positivo, especialmente em um animal conhecido por ter resposta inadequada ao estresse (Plotsky & Meaney, 1993), com amplificação da ação de glicocorticoides, provavelmente desempenha importante papel no desenvolvimento da obesidade central abdominal

(Masuzaki *et al.*, 2001). Sugeriu-se que o aumento da gordura abdominal seja definido como um marcador de "tecido adiposo disfuncional" (Despres & Lemieux, 2006), que permite alterações no metabolismo de AG livres e hipertrigliceridemia, como observado nos animais separados. O resultado do aumento de AG livres no fluxo para o fígado prejudica o metabolismo hepático (Wree *et al.*, 2011), que conduz ao aumento da resistência à insulina hepática (Fabbrini *et al.*, 2009). Como os n-3 PUFAs são potentes inibidores da glicólise hepática e da lipogênese *de novo*, através da inibição de genes envolvidos na utilização de glicose e síntese lipídica, incluindo piruvato quinase tipo L, a síntese de AG e Acetil-CoA carboxilase (Blake & Clarke, 1990), a deficiência dietética deste nutriente agravaria a síntese e o armazenamento hepático de AG (Jump & Clarke, 1999) e, por conseguinte, aumentaria o risco de lipotoxicidade hepática (Wree *et al.*, 2011).

Assim, com o aumento da resistência à insulina hepática, há diminuição da capacidade da insulina em regular negativamente a expressão do gene PEPCK como observado no grupo de ratos separados e com n-3 PUFAs deficiente (Chakravarty *et al.*, 2005; Yabaluri & Bashyam, 2010). Isto prejudica a produção de glicose no fígado e, conseqüentemente, aumenta a necessidade de produção de insulina para manter a glicemia normal. Sugere-se que este "esforço" seja um indicativo do aumento alostático encontrado no grupo (McEwen, 2002).

Sabe-se que a insulina é um dos principais reguladores dos níveis de leptina (Bradley & Cheatham, 1999; Lee *et al.*, 2007b) e que o aumento da insulina periférica encontrado no estudo pode explicar as alterações nos níveis de leptina descritos no grupo de ratos separados com n-3 PUFAs deficiente. Apesar de maior circulação dos níveis de leptina (citocina anorexigênica), ratos do grupo separado apresentaram aumento da ingestão alimentar, o que não foi explicada por diferenças do NPY do

hipotálamo (neuropeptídeo que desempenha papel importante como estimulante do apetite). Estudo encontrou aumento dos níveis de NPY mRNA somente após 48 horas de privação alimentar em fêmeas separadas, porém não houve diferenças nos níveis de expressão basal arqueadas deste peptídeo (Yoo *et al.*, 2011). Este resultado está de acordo com o encontrado, no sentido de que os níveis de NPY do hipotálamo não parecem responder aos sinais periféricos da homeostase energética nos animais do GSM da mesma forma que o GNM. Sabendo-se que a leptina diminui a liberação de NPY (Wang *et al.*, 1997), a ausência de efeito sobre estes níveis de peptídeo poderia ser interpretada como um sinal hipotalâmico de resistência à leptina no GSM com n-3 PUFAs deficientes.

Estudo que avaliou os efeitos da linhaça na dieta, fonte de AG n-3 PUFAs, não mostrou diferença no ganho de peso, consumo alimentar e eficiência calórica nos ratos. No entanto, houve diminuição significativa da glicose no sangue, colesterol total e TG nos animais que receberam linhaça, quando comparados aos controles (Marques *et al.*, 2011). Neste estudo, não se encontrou diferenças na glicemia ou colesterol, apenas nos TG, mas sendo influenciados pela intervenção neonatal. Outros estudos descreveram que a privação dietética de n-3 PUFAs por não mais de 3 meses é suficiente para provocar depleção grave de AG nos fosfolípidios hepáticos e nos TG (Malaisse *et al.*, 2009) e induz às características de síndrome metabólica (SM), incluindo a esteatose hepática, a obesidade visceral e a resistência à insulina (Cancelas *et al.*, 2007; Sener *et al.*, 2009). Do mesmo modo, estes efeitos foram vistos apenas em ratos estressados no período neonatal e não no GNM. Assim, acredita-se que a separação maternal tenha provocado aumento da vulnerabilidade a efeitos metabólicos da deficiência dietética de n-3 PUFAs.

Autores (Clarke *et al.*, 2009) têm relatado que o processo da separação materna reduz de maneira significativa as concentrações plasmáticas de n-3 PUFAs total (incluindo o ALA, EPA e DHA) em comparação aos controles. Neste estudo, não foram encontradas diferenças nos níveis periféricos de n-3 PUFAs e a dieta deficiente induziu a redução do ALA periférico apenas no GNM. É possível que os filhotes do GSM já estivessem no nível mais baixo de limite biológico (assumindo que o limite mais baixo biológico é mais elevado para o GSM), e foi indiferente para a deficiência em nosso estudo. Outra possibilidade é que se observam mais efeitos do próprio estresse no início da vida, ao invés de uma interação estresse x dieta *per se* nesse resultado.

Neste estudo, os animais expostos à separação materna e ao consumo dietético de n-3 PUFAs apresentaram aumento do AG palmitoléico. Sabe-se que o AG palmitoléico está associado ao aumento das concentrações de insulina (Lovejoy *et al.*, 2001), resistência insulínica (Vessby *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2003; Kotronen *et al.*, 2009; Mozaffarian *et al.*, 2010; Dias & Couture, 2012; Kurotani *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013), DM tipo 2 (Hodge *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2010), SM (Warensjo *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013), insuficiência cardíaca (Djousse *et al.*, 2012b) e doença coronariana (Djousse *et al.*, 2012a). O teor plasmático de AG palmitoléico é um marcador independente de trigliceridemia e adiposidade abdominal em homens (Paillard *et al.*, 2008; Mozaffarian *et al.*, 2010), os quais estão de acordo com a correlação positiva entre este AG a nível periférico e a quantidade de gordura abdominal encontrada neste estudo. Além disso, tem-se mostrado indução de esteatose hepática e aumento de expressão da síntese de AG em camundongos (Guo *et al.*, 2012), corroborando com a ideia de lipotoxicidade hepática nos animais separados submetidos a dieta deficiente em n-3 PUFAs, como discutido acima. Nossos resultados também

concordam com a literatura sobre a correlação negativa entre AG esteárico e HOMA, bem como os níveis de insulina (Wang *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2010).

A respeito do fato da dieta deficiente em n-3 PUFAs ter ocasionado, neste estudo, aumento dos níveis periféricos de DHA, ressalta-se que os grupos não tiveram diferenças em outros índices n-3 PUFAs como o Índice ômega-3 e o total de n-3 PUFAs no sangue. Uma possível explicação para o aumento dos níveis de DHA periférico baseia-se na deficiência muito suave imposta pela dieta usada. Estudo usando o conteúdo dietético diferente de ALA demonstrou que, em tal nível de deficiência, o DHA plasmático não foi afetado pela dieta (Kim *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou que os níveis de DHA diminuíram mais lentamente que os de EPA após redução de n-3 PUFAs, indicando algum tipo de retenção do DHA (von Schacky *et al.*, 1985). A nível sorológico, os efeitos do baixo consumo de n-3 PUFAs são menos severos do que em outros tecidos (Anderson & Connor, 1994). Além disso, parece que o metabolismo sanguíneo compartimental de DHA varia substancialmente de acordo com o tipo de dieta, tanto em termos de biodisponibilidade no plasma como de acumulação nos tecidos-alvos (Lemaitre-Delaunay *et al.*, 1999). Como as concentrações plasmáticas eritrocitárias de EPA e DHA, Índice de ômega-3 e o total de n-3 PUFAs têm correlações mais fracas com o teor de AG correspondente no cérebro, em comparação a outros tecidos (Tu *et al.*, 2013), os animais recebendo a dieta deficiente em n-3 PUFAs poderiam ainda ter experimentando baixos níveis de AG essenciais n-3 PUFAs em tecidos-alvos, principalmente, o cérebro, e isso poderia explicar os efeitos metabólicos observados no GSM.

Finalmente, nossa dieta deficiente é mais estreitamente relacionada com uma deficiência leve de n-3 PUFAs que pode ser facilmente encontrada em populações, portanto, pode-se argumentar que nosso trabalho tem o potencial de ser mais facilmente

transponível para as condições humanas. Sabe-se que a dieta ocidental pode chegar a razão n-6/n-3 elevada, como 30:1, quando o desejável seria variar entre 5:1 a 2:1 (Simopoulos, 2008). A proporção da nossa dieta deficiente foi de 5:1, novamente, uma deficiência leve. Este resultado adicional é importante para nossos achados, considerando que, possivelmente as interações entre o estresse precoce e a deficiência nutricional de n-3 PUFAs poderiam ter afetado ainda mais os resultados metabólicos se a deficiência dietética aplicada fosse mais intensa. Assim, sugere-se que nossos achados sejam aplicáveis a humanos, com o fato de que qualquer adulto poderia ter apresentado os mesmos ou piores níveis de deficiência dietética, como imposta no nosso modelo. É interessante destacar que o estresse neonatal interagiu com a deficiência crônica de n-3 PUFAs aumentando a vulnerabilidade metabólica. Outros estudos utilizando modelo semelhante demonstraram que a separação materna interage com a deficiência dietética de n-3 PUFAs aumentando a resposta à depressão, à recompensa e à impulsividade (Mathieu *et al.*, 2008), sendo associado com maior ansiedade e respostas de medo em situações inevitáveis, enquanto que a sua capacidade de lidar com tarefas aversivas permaneceram inalteradas (Mathieu *et al.*, 2011). Em humanos, vários estudos demonstraram que a SM é uma comorbidade associada frequentemente com depressão maior (Kahl *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2012; Seppala *et al.*, 2012).

Estudo de imagem por ressonância magnética funcional do cérebro (Ryan *et al.*, 2012) demonstrou que alterações no estriado ventral mediarão a relação entre o índice de HOMA e os sintomas de humor deprimido. Este estudo suporta a teoria de que alterações funcionais em circuitos de recompensa variam diretamente com os níveis de resistência à insulina entre os indivíduos. Além disso, o papel de n-3 PUFAs em transtornos do humor tem sido extensivamente estudado (Lin & Su, 2007; Ross *et al.*, 2007; Martins, 2009). Portanto, é possível que a resistência à insulina encontrada neste

estudo, em animais GSM expostos à dieta deficiente em n-3 PUFA, desempenha papel na explicação das alterações comportamentais descrito por (Mathieu *et al.*, 2008). Ressalta-se a importância de estudos futuros para determinar se uma dieta suplementada com n-3 PUFA poderia ter influência protetora em ratos submetidos separação materna.

9. CONCLUSÕES

Sobre a parte clínica, os achados sugerem que, a curto prazo, o consumo de AG das gestantes não influenciou o peso ao nascer das crianças entre os diferentes ambientes intrauterinos, porém as gestantes hipertensas possuíram maior consumo de AA e as diabéticas menor relação n-6/n-3. Sobre a parte experimental, a separação materna ocasionou maior ingestão alimentar, ganho de peso e alterações metabólicas decorrentes tais como: maior deposição de gordura abdominal e hipertrigliceridemia em ratos machos adultos. Este é o primeiro estudo que descreve as consequências metabólicas de interrupções na interação mãe-filhote usando este modelo. A deficiência dietética de n-3 PUFAs potencializou alterações metabólicas da separação materna, conduzindo à resistência à insulina, à leptina e alterando o perfil periférico de AG, tais como o aumento do ácido palmitoléico.

Assim, ressalta-se a importância de mais estudos que avaliem as variações na vulnerabilidade do estresse com deficiência nutricional leve a longo prazo. Os resultados podem ser relevantes para a prevenção primária de condições prevalentes na população atual, tais como a obesidade e a síndrome metabólica, especialmente em indivíduos expostos ao estresse precoce.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO I - ARTIGO PUBLICADO

Parte Clínica:

Artigo Original

Artigo aceito na revista: BMC Pregnancy and Childbirth.

Enviado: 23 de fevereiro de 2012.

Publicado: 02 de abril de 2012.

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

Autores: Juliana Rombaldi Bernardi, Charles Francisco Ferreira, Marina Nunes, Clécio Homrich da Silva, Vera Lúcia Bosa, Patrícia Pelufo Silveira and Marcelo Zubaran Goldani ¹

¹ Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

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

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

Abstract

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

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

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

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

Background

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

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

* Correspondence: mgoldani@hcpa.ufrgs.br

Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903 - Porto Alegre/RS - Brazil

To date, most of these studies were performed 1) in preexisting birth cohorts, in which the primary study hypothesis were not related to the DOHaD ideas [13-17] and 2) in developed countries. Only a few prospective birth cohorts were designed after the DOHaD concepts arose [18-23], most of them focusing on low birth weight as the main independent variable. However, many studies are demonstrating that rather than birth weight, the maternal phenotype in which the fetus will develop (maternal behavior, metabolism, drug use and diseases) is more important to determine the future child's health and disease patterns [24-31]. These new evidence prompted our research group to design this project - Impact of Perinatal Environmental Variations in the First Six Months of Life - the IVAPSA Birth Cohort.

Recent surveys support these ideas by demonstrating interactions between the environment and gene expression at different levels. Not only the cellular environment affects gene expression and protein production, but the individual's relationships with the environment may also influence aspects of behavior, morphology and gene expression, even in a matter of hours [32]. Important studies show that the influence of interactions occurred at vulnerable or susceptible periods to programming, through epigenetic effects, may persist even in a transgenerational way [33,34]. However, there are no studies to assess the interaction between changes in the intrauterine environment determinants of intrauterine growth restriction (IUGR) and the individual genetic characteristics on growth and long-term health. For example, it is unclear whether individuals born with IUGR due to exposure to smoking during pregnancy will have the same health and disease pattern as individuals born IUGR due to maternal malnutrition or other factors will. Besides, these two IUGR subtypes may interact differently with the subject's genotype to affect its health and disease patterns.

Our group is interested in understanding the long-term effects of these fetal environmental changes on the offspring's growth, behavior, metabolism and neurodevelopment, as well as in the early identification of vulnerability to the deleterious effects of these changes. Thus, this project aims to assess the impact of variations in the perinatal environment on the children's health in their first six months of life.

The aims of this longitudinal study are divided in four domains:

1. Nutritional

There is an association between the IUGR infant and acceleration growth in early postnatal life and the emergence of insulin resistance, visceral obesity and glucose intolerance in adult life [35]. In addition, it is known

that about 10% of IUGR children will never catch up in growth, a condition that may have an impact in the child's metabolism and later risk for disease [36]. In this study we intend to investigate whether children born IUGR for different reasons grow differently. Besides, we intend to verify interactions between these IUGR types with environmental variations (nutrition, breast milk composition, maternal behavior), aiming at identifying early vulnerability for growth failure or obesity risk and its related metabolic consequences.

2. Behavioral

Studies from our group [37,30] and others [38,39] have shown that the IUGR and smoking during gestation are associated with changes in eating behavior in the long term, increasing the preference for palatable foods. This altered relationship with food cues is identifiable already early in life [40]. Besides, we [41] and others [42-44] have shown that low birth weight leads to increased vulnerability to sedentary behavior, in a complex interaction with environmental variables such as SES (socioeconomic status) [41]. Therefore it would be of extreme importance to investigate if different IUGR profiles would lead to differential patterns of vulnerability to obesity by altering food practices or the willing to exercise from early stages in life.

3. Molecular

It is known that there is an interaction between genotype and size at birth on the risk for diabetes [45]; moreover other studies have shown interaction between polymorphic variations and perinatal environment on risk for disease in adulthood [46,47] reflecting a gene-environment interactions. However, there are only a few studies investigating how variations in maternal phenotype interact with the genotype of mother-child pairs and impact child growth and health.

4. Neurodevelopment

Evidence suggests that there are adverse effects of being born IUGR on the functioning and development of the offspring, affecting the cognitive development [48,49], academic achievement/professional attainment [50] and the risk for psychopathology in later life [51,52]. Children who are exposed to malnutrition early in life may experience lasting effects on their brain architecture and persistent disruptions of their stress response systems [6,53]. However, only a few studies investigate the interaction between IUGR and environmental variations such as nutrition on these outcomes [54]. Besides that, it is not known if different IUGR profiles derived from the various maternal phenotypes during gestation (maternal smoking, hypertension, etc.) or right after birth (maternal care, depression, etc.) would have a differential vulnerability to these neurodevelopment alterations.

Methods/Design

This is a thematic, prospective, longitudinal birth cohort with the aim to assess the interactions between the maternal phenotype during gestation (maternal smoking, hypertension, diabetes), the maternal/fetal genotype and their associations with outcomes related to growth, behavior and neurodevelopment (Figure 1).

Participants

Postpartum women assisted by Grupo Hospitalar Conceição (GHC) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) residing in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Exclusion criteria are HIV patients, and newborn from twin gestations, having malformations or chronic disease at birth or requiring hospitalization.

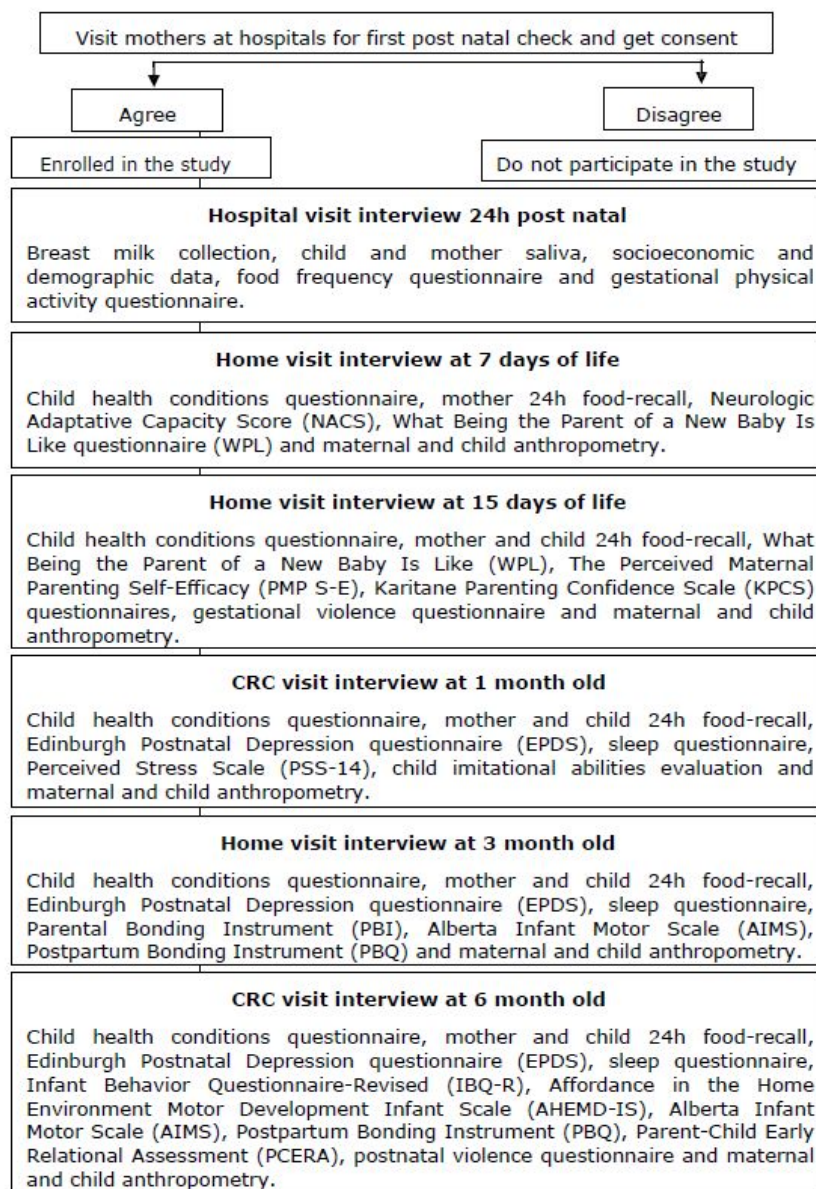


Figure 1 Flow diagram of the recruitment strategy for the cohort study and data collection procedures.

Outcome measures

The proposed primary and secondary outcome measures are shown in Table 1.

General information

Interviews will be performed at home or at the clinical research center (CRC) in located at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). During the interviews, familial demographic, socioeconomic, and environmental variables will be investigated. The ABEP (Brazilian Researching Companies Association) questionnaire [55], an official governmental document that assesses the economic status for the Brazilian population, will be applied. Mothers will be evaluated regarding the obstetric and medical history, the use of medications use and smoking habits. Children will be evaluated using the birth data collected from the charts (date of birth, sex, age, weight and length, Apgar score and complications), as well as with questions about breastfeeding, complementary feeding and a questionnaire about sleep behavior.

Table 1 Outcome measures for the cohort study

Outcome	Parental outcomes	Child outcomes
1. Nutritional	FFQ	Questions about breastfeeding and complementary feeding
1.1 Dietary Data	24 h-recalls -	24 h-recalls
1.2 Physical activity	IPAQ short form	-
1.3 Anthropometry	Body weight Height Arm circumference Subscapular skinfold Waist circumference Triceps skinfold	Birth data Bodyweight Length Arm circumference Head circumference Subscapular skinfold Triceps skinfold
2. Behavior	WPL PMP S-E KPCS PSS-14 PBI PBQ EPDS Domestic Violence	IBQ-R PCERA - - - - - -
3. Neurodevelopment	- - - -	NACS AIMS AHEMD-IS Child imitational abilities evaluation
4. Molecular	Breast milk DNA	DNA -

Team training and manual

During the first step of the study, the researchers will be received training weekly during one year, based on questionnaires, protocols and anthropometrics measures, and invited experts in the area: psychiatrist, neurologist and pediatrics. A training manual will be used to ensure standardization of instructions and consistency of training standards for project workers throughout the life of the project.

Data collections instruments according to the four domains

Nutritional

Dietary data Food intake estimate will be assessed by 24 h recall applied for both mother and child in different occasions and by an 88-items Food Frequency Questionnaire (FFQ), validated for the pregnant women in Brazil [56]. The quantitative analysis of macronutrients and micronutrients consumed will be calculated with the use of NutriBase[®] software (Versão NB7 Network) [Phoenix, AZ, USD].

Physical activity Physical activity during pregnancy will be assessed by the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) short form. The items in the IPAQ short form were structured to provide separate scores on walking, moderate-intensity and vigorous-intensity activity [57]. This instrument is proposed by the World Health Organization (WHO) to determine physical activity levels, and was used in different studies having a good correlation with actual activity levels [58].

Anthropometry Anthropometric measurements will be measured in duplicate to ensure minimum inter- and intra-observer variability, and taken through the use of standard techniques and calibrated equipment.

Body weight of the mothers and infants will be measured in kilograms with a portable digital electronic scale (Marte[®]) accurate to the nearest 50 g, wearing minimal clothing and without shoes. The infants will be weight in the arms of mothers, for the scale tare. The infant's weight will be then calculated by subtracting the total body weight of the mother from the weight of both mother and child.

Stature of mothers and infants will be measured with an extensible portable stadiometer (Altuxata[®]). The infant's recumbent length will be measured in a supine position, placed on a flat, stable surface such as a table. The mother height will be measured using a height board mounted at a right angle between a level floor and against a straight, vertical surface such as a wall or pillar.

Weight in kilograms and height in meters when used to calculate body mass index (BMI). Body weight and a weight gain of the pregnant women will be reported from the charts. The gestational weight gain and

pregnancy BMI will be classified according to the recommendations of the Institute of Medicine [59]. The nutritional status of infants will be evaluated using age specific values of height, weight and BMI using the World Health Organization [60] growth chart.

Arm circumference, head and waist circumference will be measured with an inextensible tape measure. The arm circumference of mothers and infants will be measured always at the left arm at the medium point between the acromium and olecranon. Head circumference of infants will be measured at the largest occipitofrontal circumference. The waist circumference of mothers will be measured midway between the costal margin and iliac crest.

The subscapular and triceps skinfolds will be assessed using a caliper (Lange®). In infants skinfold thickness will be measured starting at 3 months. Triceps skinfold of mothers and infants will be measured at the same levels as the arm circumference and subscapular skinfold will be measured and at the lower angle of the scapula, in the axis of the skin crease.

The arm and head circumference, subscapular and triceps skinfolds of infants will be evaluated using age specific using the World Health Organization [61] growth chart.

Questionnaires assessing behavior

The following instruments will be applied to assess parental care: the What Being the Parent of a New Baby Is Like (WPL) [62]; the Perceived Maternal Parenting Self-Efficacy (PMP S-E) [63] and the Karitane Parenting Confidence Scale (KPCS) [64] at the home visit interview at 15 days of life. These protocols will be translated and validated to Brazilian Portuguese during the course of team training.

The WPL was developed to examine parents' perceptions of themselves as parents and of the parenting experience with young infants, and was revised by improving its subscales: Success, Centrality and Life Change [62]. It consists of 25 items on a 9-point graphic rating scale. The end points of each scale were labeled with a bipolar descriptor, for example, "not at all difficult" and "very difficult". It was used in study verifying maternal satisfaction scores [65].

The PMP S-E tool, which is made up of 20 items representing four theorized subscales, was developed to assess mothers' perceptions of their ability to parent (maternal parenting self-efficacy) [63]. In this instrument, the mother will choose if she 'strongly disagrees' (score 1) to 'strongly agrees' (score 4) with the situation described. A low score on this scale indicates a low maternal self-efficacy. It was used in study verifying maternal social support and maternal parental self-efficacy with postnatal depression at 6 weeks post delivery [66].

The KPCS tool, a 15-item perceived parental self-efficacy measure, is useful clinically in screening for parenting difficulties, targeting interventions and evaluating outcomes [64]. In this instrument, the mother will choose if the situations described are true or not at all, or at which frequency they are true, by choosing to answer "no", "hardly ever"; "no, not very often"; "yes, some of the time"; and "yes, most of the time". It was used in study assessing the overall construct of parenting confidence and the correlated to Being a Mother scale (BaM-13) [67].

The Perceived Stress Scale (PSS-14) will be applied when child is 1 month old. The instrument is composed by 14 questions that were designed to check how unpredictable, uncontrollable and overloaded respondents evaluate their lives [68]. This instrument has questions with response options that range from zero to four (0 = never; 1 = almost never; 2 = sometimes; 3 = often and 4 = always). It was used in studies addressing perceived stress, which assesses the extent to which a respondent considers life situations to be stressful, and the association with food consumption [69].

The Parental Bonding Instrument (PBI) is composed by 25 questions in which the respondent answers in relation to paternal or maternal behavior until his 16 years of age [70,71]. The instrument will be applied when the child is 3 months of life. It is classically used to address parental behavior in two subscales: warmth and overprotection, showing high association with the individual's depression and anxiety in adult life [72]. Because parental care shows some stability throughout generations [73] this instrument could potentially predict the parental care that the child will be raised on during her childhood [74].

The Infant Behavior Questionnaire-Revised (IBQ-R) is composed of 184 items that assess the following the following 14 dimensions of temperament in infant: Activity Level, Distress to Limitations, Approach, Fear, Duration of Orienting, Smiling and Laughter, Vocal Reactivity, Sadness, Perceptual Sensitivity, High Intensity Pleasure, Low Intensity Pleasure, Cuddliness, Soothability, and Falling Reactivity. Parents will be asked to rate the frequency of specific temperament-related behaviors observed over the past week (or sometimes 2 weeks) in an ordinal scale ranging from 1 (never) to 7 (always) [75]. The instrument will be applied when child is 6 months of life. It was used in studies examining the relationship between breastfeeding and maternally-rated infant temperament [76].

The Parental Bonding Questionnaire (PBQ) is a screening instrument specifically targeted at disorders of the early mother-infant relationship. It is composed by 25 questions, in which the mother will choose responses to each item on a 6-point Likert scale, with the scale

points labelled "always", "very often", "quite often", "sometimes", "rarely" and "never" [77]. It was used in studies to screen for mother-infant relationship disorders and to assess the severity of the disorders [78].

Postpartum depression is the most common complication of childbearing. The 10-question Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) is a valuable and efficient way of identifying women at risk for perinatal depression [79]. The scale indicates how the mother has felt during the past seven days and the response format is frequency-based. The responses to the 10 items are added together to obtain a score. It was used in studies assessing the prevalence and the background factors of maternal depressive symptoms and their relation to the quality of mother-infant interaction in a group of preterm infants and their mothers and the number of postnatal signs of depression was associated negatively with the quality of the maternal interaction behaviour with their preterm infants [80].

To know if mothers suffered domestic violence, a specific questionnaire will be applied: Abuse Assessment Screen [81,82] which has already been used and published by a group of Porto Alegre, Brazil [83]. This protocol is divided into four parts: oral aggressions, physical aggressions, aggressions with gun, knife or other and sexual abuse. It will be applied in two moments and will assess violence during gestation and post gestational violence.

The Parent-child Early Relational Assessment (PCERA) was designed to measure the quality of affect and behavior in parent-child interactions [84]. The instrument uses ratings that are based on observations of 5-minute videotaped interactions, including feeding, structured task, and free play. The PCERA will be applied at 6 months visit.

Neurodevelopment

The Neurologic Adaptive Capacity Score (NACS) was developed to detect central nervous system depression in term neonates exposed to intrapartum medications [85,86]. After that, the testing was used in numerous other studies as a form of assessment of neurological status of the newborn, with good correlation with long term neurodevelopmental assessment [87]. It consists of 20 items arranged into two subscales: adaptive capacity and neurologic evaluation. The neurologic subscale is further divided into four parts testing passive tone, active tone, primary reflexes, and general neurologic status. Each of the 20 items is assigned 0, 1, or 2 points depending on the infant's response. The maximum total score possible is 40. The NACS will be applied at the 7 days visit.

The Alberta Infant Motor Scale (AIMS) is a standardized scale that intends to evaluate and monitor the gross motor function in infants, by means of

spontaneous motor activity observation from birth to 18 months or until the child learns to walk. It was developed to assess infants at risk of developing neuromotor dysfunctions. It quantifies gross motor activity in a global score, taking into consideration three criteria related to the quality of movement: weight distribution, posture and movement against the force of gravity [88,89]. It has a good correlation with the final gross motor abilities attained in later childhood [90]. The AIMS will be applied at the 3 and 6 months visit.

The Affordances in the Home Environment for Motor Development - Infant Scale (AHEMD-IS) will be applied at 6 months of life. It aims to assess the quantity and quality of affordances in the home environment that are conducive to motor development for infants 3- to 18 months. The structure for the AHEMD-IS was founded on the same 5-factor model 1 proposed in the original AHEMD [91]. As with the AHEMD, three types of tests were determined acceptable: simple dichotomic choice, 4-point Likert-type scale, and description-based queries. In addition, pictorial examples of the general classification are provided to help parents identify available categories and specific items. The AHEMD scores were shown to be associated with motor development in several studies [92].

The presence and the nature of hand fingers and facial movement imitation will be examined in infants [93,94]. The instrument uses ratings that are based on observations of 6-minute videotaped. The child imitational abilities evaluation will be applied at 1 month visit. Study of mirror-neurons systems is of functional importance to individual's role in the development of imitation [95].

Biological samples

Breast milk collection and storage for milk composition and hormones The women will be advised to wash their hands with soap and water before milking and washing their breasts with water [96,97]. The collection procedure will be performed by the mothers, under appropriate supervision provided by the researcher. Milk was collected, under supervision, by manual expression directly into a plastic recipient. To express breast milk by hand mothers or researchers will have to massage in the breast by starting at the top of the breast in circular manner with the C shape position. After collection, samples will be properly transported and stored at -80°C at the Translational Pediatrics Laboratory until analysis.

Fatty acids will be determined in phospholipids, triglyceride, and cholesterol ester fractions. Lipids will be extracted from serum with chloroform-methanol (2:1 by volume) according to the method of Folch et al., 1957 [98]. Fatty acid fractions will be separated by thin-layer chromatography using a silica gel plate and mobile-phase development, using a mixture of hexane, diethyl ether, and acetic acid glacial [99]. Fractions will be

visualized by iodine vapor. Phospholipids, triglyceride, and cholesterol ester bands were scraped into separate tubes, and lipids were extracted from silica with chloroform-methanol and converted into fatty acid methyl esters by boron trifluoride catalysis [100]. The methyl esters will be then separated and measured by gas chromatography on specific capillary column. Analysis was performed on a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. Helium will be used as carrier gas and nitrogen as make-up gas. The injection port temperature will be 200°C and the detector temperature 250°C. The column temperature will be held at 160°C for 5 min and increased to 190°C at a rate of 2°C/min; it was then held at this temperature for 2 min, and increased again to 220°C at a rate of 1°C/min. The identity of each fatty acid peak will be ascertained by comparison of peak retention time with a previously characterized mixture of 20 fatty acids. The relative amount of each fatty acid (% of total fatty acid) will be quantified by integrating the area under the peak and dividing the result by the total area for all fatty acids.

Total carbohydrates from milk will be determined by phenol-sulfuric acid assay, using the [101] method in a microplate format. Protein concentration will be quantified using bicinchoninic acid (BCA) protein assay. Milk leptin and corticosterone levels will be analyzed by ELISA using commercial kits.

DNA extraction and genotyping The DNA will be extracted from saliva samples collected from mothers and their children at the postpartum interview using the Isohelix DNA Buccal Swabs® (SK-2, Isohelix, United Kingdom). Mothers will be instructed to first rinse with 100 ml of distilled water and the collection is made by scraping the inner face of the cheeks with sterile cytological brushes, with circular movements repeated about 30 times. Then the brushes have their outer portion of the stems cut and placed in 2 ml microtubes. The samples will be stored in the refrigerator for a period of 2 to 30 days before extraction.

For the DNA extraction, 200 µl TES (10 mM Tris HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.6% SDS) and 5 µl of proteinase K (10 mg/mL) are added to the tubes containing the swab and incubated for 2 h at 42°C. Then, the brush is removed and it is added 42 µl of saturated NaCl (6 M), stirring by hand with vigor. The sample will be centrifuged for 1 minute at 15,000 g, the supernatant transferred to a new tube and added 2 times the volume of absolute ethanol. The tubes are agitated and centrifuged for 1 minute at 15,000 g. The pure ethanol is discarded and will be added 1 ml of 70% ethanol by inverting the tubes several times to wash the pellet. Then tubes are centrifuged again for 1 minute at 15,000 g and the supernatant is discarded.

Rinsing with 70% ethanol is repeated and, after discarding the supernatant, the tubes remain open for 30 minutes to evaporate residual ethanol. The DNA is dissolved in 60 µl TE 10:0.1 (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA).

Leptin Gene and Leptin Receptor Proopiomelanocortin gene (Pomc), Fat Mass- and Obesity-Associated gene (FTO, rs9939609 gene containing the risk A allele) and Dopamine receptor D4 gene (Drd4) expression will be measured by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using an inventoried TaqMan FAM/MGB assay (Applied Biosystems). Expression values will be normalized by GAPD endogenous control expression using a TaqMan VIC/MGB endogenous control inventoried assay (Applied Biosystems, 4352340E). Quantification will be carried out by Nanodrop. Reactions will be performed in ABI Prism 7500 sequence detection instrument, which directly detects the RT-PCR product without downstream processing. Reactions will be carried out in a total volume of 12 ml containing 6 ml of 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (containing ROX, AmpliTaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, and MgCl₂), 0.6 ml of 20x TaqMan Gene Expression Assay, 0.6 ml of 20x TaqMan Endogenous Control, 3.8 ml of water and 1 ml of DNA solution. Cycling program consists of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. All reactions will be performed in triplicates. Relative expression levels will be determined by the ddCt method [101,102].

Sample size

Based on the effect size of 0.5 standard deviation (SD) of difference between the average Z-score of weight at 12 months of age, level of significance of 5% and test power of 80%, was calculated 72 mother-child pairs per group and 144 pairs in the control group, summing up a total 432 pairs calculating a loss to follow up of 20%, the size of the final sample consists of 521 mother-child pairs.

Data analyses

Analysis will be conducted at the individual level using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 18.0. It will be performed a descriptive analysis of continuous and categorical variables. The parametric data will be expressed as mean ± standard deviation. To detect the difference between variables with normal distribution, it will be used the ANOVA/ANCOVA tests followed by Bonferroni post hoc. The chi-square will be used to detect differences in proportions between groups. Significance level of 5% ($p < 0.05$) and 95% range will be considered.

Ethical considerations

Ethical approval to conduct this study has been granted by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) with the number 11-0097 and Ethics Committee of Grupo Hospitalar Conceição (GHC) with the number 11-027. After the eligibility criteria are met, postpartum women will be invited to enter the study, and only those that provide a written consent will be included.

Financial support

The research will be supported by National Support Program for Centers of Excellence PRONEX 2009; FAPERGS/CNPq 10/0018.3 and FIPE/HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Discussion

To our knowledge, this is the first prospective cohort to incorporate different maternal phenotypes in terms of pathological states to provide evidence of impact in developmental origins of health and disease.

Epidemiological studies in different parts of the world relate to the influence of certain environmental factors in early life with changes in the genetic expression, determining a peculiar profile of health and disease. Also, clinical and preclinical research point out to in the same direction, suggesting a strong association between environmental damages that occurred during the fetal period or in the early stages of extrauterine life with the emergence of chronic diseases throughout life. These findings provide new links of causality, inferring the possibility of building early behavioral, neurochemical and metabolic adjustments determinants of morbid outcomes in the long term.

Future perspectives for the IVAPSA Birth Cohort include the follow up these children until 5 years at least. The IVAPSA Project is a promising research platform that can contribute to the knowledge on the relationship between perinatal events and their consequences on children's and adult health.

Abbreviations

AHEMD-IS: Affordances in the home environment for motor development-infant scale; AIMS: Alberta infant motor scale; BaM: Being a mother scale; BCA: Bicinchonnic acid; BMI: Body mass index; CRC: Clinical research center; DOHaD: Development origins of health and disease; EPDS: Edinburgh postnatal depression scale; FFQ: Food frequency questionnaire; GHC: Grupo Hospitalar Conceição; HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; IBQ-R: Infant behavior questionnaire-revised; IUGR: Intrauterine growth restriction; IPAQ: International physical activity questionnaire; IVAPSA: Impact of perinatal environmental variations in the first six month of life; KPCS: Katarine parenting confidence scale; NACS: Neurologic adaptive capacity score; PBI: Parental bonding instrument; PBQ: Parental bonding questionnaire; PCERA: Parent-child early relational assessment; PMP S-E: Perceived maternal parenting self-efficacy; PSS-14: Perceived stress scale; SES: Socioeconomic status; SD: Standard deviation; SPSS: Statistical package for

social sciences; WPL: What being the parent of a new baby is like; WHO: World Health Organization

Acknowledgements

We thank all the other researchers from the IVAPSA Birth Cohort: Adolfo Rodrigues Reis, Aldo Bolten Lucion, Amanda Brondani Mucellini, André Krümel Portella, Bruno Carlo Cerpa Aranda, Carla da Silva Benetti, Carla Dalmaç, Carmem Juracy Gottfried, Carolina Blaya, Cláudio Felipe Kolling da Rocha, Cristie Grazziotin Noschang, Daniel Prá, Deusa Vendite, Edmara Nunes Gonçalves, Elisa C. Winkelmann-Duarte, Fernanda Urruth Fontella, Gilberto Luiz Sanvitto, Giovana Duzzo Gamaro, Giovanni Abrahão Sahum Júnior, Giseli Gus Manfro, Ilaine Schuch, Isabel Werlang, Jean Pierre Oses, Jorge Alberto Quillfeldt, Luciani M. de O. da Fonseca, Luciano Isolani, Luisa Amalia Diehl, Márcia Giovanardi, Márcia Scherem de Azevedo, Márcio Bonesso Alves, Mariana Dihl Schiffner, Mariana Lopes de Brito, Priscyla Bones Rocha, Rachel Krolow, Rafaela Behs Jarros, Rafaela da Silveira Corrêa, Renata de Souza Escobar, Ricardo Azevedo da Silva, Ricardo Tavares Pinheiro, Silvana de Almeida, Ursula da Silveira Matte.

We also thank the financial support from National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX 2009), FAPERGS/CNPq 10/0018.3, Projeto IVAPSA - Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Adulto; Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA); Brazilian National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and the Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Brazil.

Finally, we thank the participant families for their time and patience.

Authors' contributions

JRB was responsible for the data collection, executed the IVAPSA study and drafted the manuscript. CFF executed the IVAPSA study and drafted the manuscript. MN was responsible for the data collection, executed the IVAPSA study and drafted the manuscript. VLB supervised the IVAPSA study. CH da S supervised the IVAPSA study. PPS was responsible for the study design, supervised the IVAPSA study and drafted the manuscript. MZG was responsible for the study design, coordinated the IVAPSA study and drafted the manuscript. IVAPSA group were responsible for the data collection and executed the IVAPSA study. All authors meet the criteria for authorship and have read and approved the final manuscript.

Authors' information

¹ Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 23 February 2012 Accepted: 2 April 2012

Published: 2 April 2012

References

1. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C: Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002, 31:1235-1239.
2. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Jaddoe VW, Osmond C, Barker DJ: Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* 2002, 45:342-348.
3. Silveira VM, Horta BL: Birth weight and metabolic syndrome in adults: meta-analysis. *Rev Saude Publica* 2008, 42:10-18.
4. Davies AA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Litchfield P: Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees. *Circulation* 2004, 110:1258-1262.
5. Szathmari M, Vasarhelyi B, Szabo M, Szabo A, Reusz GS, Tulassay T: Higher osteocalcin levels and cross-links excretion in young men born with low birth weight. *Calcif Tissue Int* 2000, 67:429-433.
6. Jones A, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulson P, Phillips DI: Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91:1868-1871.
7. Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, de Groot E, Stok WJ, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP, Roseboom TJ: Maternal nutrition during gestation

- and carotid arterial compliance in the adult offspring: the Dutch famine birth cohort. *J Hypertens* 2007, 25:533-540.
8. Jones A, Beda A, Ward AM, Osmond C, Phillips DI, Moore VM, Simpson DM: Size at birth and autonomic function during psychological stress. *Hypertension* 2007, 49:548-555.
 9. Thompson C, Syddall H, Rodin I, Osmond C, Barker DJ: Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *Br J Psychiatry* 2001, 179:450-455.
 10. Rice F, Harold GT, Thapar A: The effect of birth-weight with genetic susceptibility on depressive symptoms in childhood and adolescence. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2006, 15:383-391.
 11. Kamisto V, Christensen K, Vaupel JW: No increased mortality in later life for cohorts born during famine. *Am J Epidemiol* 1997, 145:987-994.
 12. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP: Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 185:93-98.
 13. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ: Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001, 322:949-953.
 14. Syddall HE, Sayer AA, Simmonds SJ, Osmond C, Cox V, Dennison EM, Barker DJ, Cooper C: Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2005, 161:1074-1080.
 15. Lumey LH, Ravelli AC, Wiessing LG, Koppe JG, Treffers PE, Stein ZA: The Dutch famine birth cohort study: design, validation of exposure, and selected characteristics of subjects after 43 years follow-up. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1993, 7:354-367.
 16. Goldani MZ, Bettiol H, Barbieri MA, Tonkins A: Maternal age, social changes, and pregnancy outcome in Ribeirao Preto, southeast Brazil, in 1978-79 and 1994. *Cad Saude Publica* 2000, 16:1041-1047.
 17. Barros AJ, Da Silva dos Santos I, Victora CG, Albernaz EP, Domingues MR, Timm IK, Matijasevich A, Bertoldi AD, Barros FC: [The 2004 Pelotas birth cohort: methods and description]. *Rev Saude Publica* 2006, 40:402-413.
 18. Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Oken E, Gillman MW: Dietary quality during pregnancy varies by maternal characteristics in Project Viva: a US cohort. *J Am Diet Assoc* 2009, 109:1004-1011.
 19. Vrijheid M, Casas M, Bergstrom A, Carmichael A, Cordier S, Eggesbo M, Eller E, Fantini MP, Fernandez MF, Fernandez-Somoano A, et al: European birth cohorts for environmental health research. *Environ Health Perspect* 2012, 120:29-37.
 20. van Eijsden M, Vrijkotte TG, Gemke RJ, van der Wal MF: Cohort profile: the Amsterdam Born Children and their Development (ABCD) study. *Int J Epidemiol* 2011, 40:1176-1186.
 21. Jaddoe VW, van Duijn CM, van der Heijden AJ, Mackenbach JP, Moll HA, Steegers EA, Tiemeier H, Uitterlinden AG, Verhulst FC, Hofman A: The generation R study: design and cohort update 2010. *Eur J Epidemiol* 2010, 25:823-841.
 22. Shea AK, Streiner DL, Fleming A, Kamath MV, Broad K, Steiner M: The effect of depression, anxiety and early life trauma on the cortisol awakening response during pregnancy: preliminary results. *Psychoneuroendocrinology* 2007, 32:1013-1020.
 23. Cardoso V, Buis G: Factores Etiológicos Del Parto Pretérmino Y Consecuencias Sobre El Crecimiento: Cohortes de Nacimiento En Dos Ciudades Brasileñas. 12º Encuentro Nacional de Investigación Pediátrica: 20-21 May 2010; Bariloche Ministerio da Ciencia, Tecnologia e Innovación Productiva de La Nación; 2010, 34.
 24. Glatt SJ, Bolanos CA, Trksak GH, Crowder-Dupont C, Jackson D: Prenatal cocaine exposure alters behavioral and neurochemical sensitization to amphetamine in adult rats. *Neuropharmacology* 2000, 39:599-610.
 25. Farkas S, Hussein J, Ariano RE, Sitar DS, Hasan SU: Prenatal cigarette smoke exposure: pregnancy outcome and gestational changes in plasma nicotine concentration, hematocrit, and carboxyhemoglobin in a newly standardized rat model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, 214:118-125.
 26. Franke K, Harder T, Aerts L, Melchior K, Fahrenkrog S, Rodekamp E, Ziska T, Van Assche FA, Dudenhausen JW, Plagemann A: 'Programming' of orexigenic and anorexigenic hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats. *Brain Res* 2005, 1031:276-283.
 27. Purcell RH, Sun B, Pais LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL: Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 2011, 104:474-479.
 28. Maniam J, Morris MJ: Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 2010, 35:717-728.
 29. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG: The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am J Obstet Gynecol* 2007, 196:555, e551-e557.
 30. Ayres CSP, Barbieri MA, Portella AK, Agranomik A, Silva AAM, Goldani MZ: Exposure to maternal smoking during fetal life affects food preferences in adulthood independent of the effects of intrauterine growth restriction. *J Dev Orig Health Dis* 2011, 2:162-167.
 31. Dode MASO SI, Gonzalez DA: Anthropometry from birth to 24 months among offspring of women with gestational diabetes: 2004 Pelotas Birth Cohort. *J Dev Orig Health Dis* 2010, 2:1-8.
 32. Pankh VN, Clement T, Fernald RD: Physiological consequences of social descent: studies in *Astatotilapia burtoni*. *J Endocrinol* 2006, 190:183-190.
 33. Champagne F, Meaney MJ: Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress reactivity. *Prog Brain Res* 2001, 133:287-302.
 34. Zhang TY, Bagot R, Parent C, Nesbitt C, Bredy TW, Caldji C, Fish E, Anisman H, Szyf M, Meaney MJ: Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. *Biol Psychol* 2006, 73:72-89.
 35. Morrison JL, Duffield JA, Muhlhauser BS, Gentili S, McMillen IC: Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity. *Pediatr Nephrol* 2010, 25:669-677.
 36. Karlberg JP, Albertsson-Wikland K, Kwan EY, Lam BC, Low LC: The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res* 1997, 48(Suppl 1):17-24.
 37. Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, Bettiol H, Agranomik M, Silva AA, Goldani MZ: Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res* 2009, 65:215-220.
 38. Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ: Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* 2008, 88:1648-1652.
 39. Stein AD, Rundle A, Wada N, Goldbohm RA, Lumey LH: Associations of gestational exposure to famine with energy balance and macronutrient density of the diet at age 58 years differ according to the reference population used. *J Nutr* 2009, 139:1555-1561.
 40. Silveira PP, Agranomik M, Faras H, Portella AK, Meaney MJ, Levitan RD: Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. *Pediatr Res* 2012, 71:293-298.
 41. Fernandes FSPA, Barbieri MA, Bettiol H, Silva AAM, Agranomik M, Silveira PP, Goldani MZ: Risk factors for sedentary behavior in young adults: similarities in the inequalities. *J Dev Orig Health Dis* 2010, 1:255-261.
 42. Hallal PC, Wells JC, Reichert FF, Anselmi L, Victora CG: Early determinants of physical activity in adolescence: prospective birth cohort study. *BMJ* 2006, 332:1002-1007.
 43. Hovi P, Andersson S, Eriksson JG, Jarvenpaa AL, Strang-Karlsson S, Makiitie O, Kajantie E: Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N Engl J Med* 2007, 356:2053-2063.
 44. Kajantie E, Strang-Karlsson S, Hovi P, Raikonen K, Pesonen AK, Heinonen K, Jarvenpaa AL, Eriksson JG, Andersson S: Adults born at very low birth weight exercise less than their peers born at term. *J Pediatr* 2010, 157:610-616, 616 e611.
 45. Eriksson JG, Lindi V, Uusitupa M, Forsen TJ, Laakso M, Osmond C, Barker DJ: The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on insulin sensitivity and insulin metabolism interact with size at birth. *Diabetes* 2002, 51:2321-2324.
 46. Puddu M, Fanos V, Podda F, Zaffanello M: The kidney from prenatal to adult life: perinatal programming and reduction of number of nephrons during development. *Am J Nephrol* 2009, 30:162-170.
 47. Godfrey KM, Lillycrop KA, Hanson MA, Burdge GC: Epigenetic Mechanisms in the Developmental Origins of Adult Disease Epigenetic Aspects of Chronic Diseases Edited by: Roach HI, Bromer F. Oreffo ROC: Springer London; 2011:187-204.
 48. McCarton CM, Wallace IF, Divora M, Vaughan HG Jr: Cognitive and neurologic development of the premature, small for gestational age

- infant through age 6: comparison by birth weight and gestational age. *Pediatrics* 1996, 98:1167-1178.
49. Hutton JL, Pharoah PO, Cooke RW, Stevenson RC: Differential effects of preterm birth and small gestational age on cognitive and motor development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 1997, 76:F75-F81.
 50. Strauss RS: Adult functional outcome of those born small for gestational age: twenty-six-year follow-up of the 1970 British Birth Cohort. *JAMA* 2000, 283:625-632.
 51. Wiles NJ, Peters TJ, Heron J, Gunnell D, Emond A, Lewis G: Fetal growth and childhood behavioral problems: results from the ALSPAC cohort. *Am J Epidemiol* 2006, 163:829-837.
 52. Lahti J, Raikkonen K, Pesonen AK, Heinonen K, Kajantie E, Forsen T, Osmond C, Barker DJ, Erikson JG: Prenatal growth, postnatal growth and trait anxiety in late adulthood - the Helsinki birth cohort study. *Acta Psychiatr Scand* 2010, 121:227-235.
 53. de Bie HM, Oostrom KJ, Delemarre-van HAde Waal: Brain development, intelligence and cognitive outcome in children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2010, 73:6-14.
 54. Rao MR, Hediger ML, Levine RJ, Naficy AB, Vik T: Effect of breastfeeding on cognitive development of infants born small for gestational age. *Acta Paediatr* 2002, 91:267-274.
 55. Critério de classificação econômica 2011. [<http://www.abep.org/novo/>].
 56. Giacomello A, Schmidt MI, Nunes MAA, Duncan BB, Soares RM, Manzolli P, Camey S: Validação relativa de Questionário de Frequência Alimentar em gestantes usuárias de serviços do Sistema único de Saúde em dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Saude Mater Infant* 2008, 8:445-454.
 57. International Prevalence Study. [<https://sites.google.com/site/theipaq/>].
 58. Ekelund U, Sepp H, Brage S, Becker W, Jakes R, Hennings M, Wareham NJ: Criterion-related validity of the last 7-day, short form of the International physical activity questionnaire in Swedish adults. *Public Health Nutr* 2006, 9:258-265.
 59. Institute of Medicine: Weight gain during pregnancy: Reexamining the Guidelines Washington: Institute of Medicine; 2009.
 60. World Health Organization: Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and Development Geneva: World Health Organization; 2006.
 61. World Health Organization: Child Growth Standards: head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and Development Geneva: World Health Organization; 2007.
 62. Chang AS, Pridham KF: What being the parent of a new baby is like: revision of an instrument. *Res Nurs Health* 1989, 12:323-329.
 63. Barnes CR, Adamson-Macedo EN: Perceived Maternal Parenting Self-Efficacy (PMP S-E) tool: development and validation with mothers of hospitalized preterm neonates. *J Adv Nurs* 2007, 60:550-560.
 64. Cmcec R, Barnett B, Matthey S: Development of an instrument to assess perceived self-efficacy in the parents of infants. *Res Nurs Health* 2008, 31:442-453.
 65. Horowitz JA, Damato EG: Mother's perceptions of postpartum stress and satisfaction. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1999, 28:595-605.
 66. Leahy-Warren P, McCarthy G, Corcoran P: First-time mothers: social support, maternal parental self-efficacy and postnatal depression. *J Clin Nurs* 2012, 21:388-397.
 67. Matthey S: Assessing the experience of motherhood: the Being a Mother Scale (BaM-13). *J Affect Disord* 2011, 128:142-152.
 68. Luft CD, Sanches Sde O, Mazo GZ, Andrade A: [Brazilian version of the Perceived Stress Scale: translation and validation for the elderly]. *Rev Saude Publica* 2007, 41:606-615.
 69. 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.
 70. Parker G: Parental characteristics in relation to depressive disorders. *Br J Psychiatry* 1979, 134:138-147.
 71. Hauck S, Schestatsky S, Terra L, Knijnik L, Sanchez P, Ceitlin LH: Adaptação transcultural para o português brasileiro do Parental Bonding Instrument (PBI). *Rev psiquiatr Rio Gd Sul* 2006, 28:61-68.
 72. Spokas M, Heimberg RG: Overprotective Parenting, Social Anxiety, and External Locus of Control: Cross-sectional and Longitudinal Relationships. *Cogn Ther Res* 2009, 33:543-551.
 73. Wilhelm K, Niven H, Parker G, Hadzi-Pavlovic D: The stability of the Parental Bonding Instrument over a 20-year period. *Psychol Med* 2005, 35:387-393.
 74. Tsaousis I, Mascha K, Giovazolias T: Can Parental Bonding Be Assessed in Children? Factor Structure and Factorial Invariance of the Parental Bonding Instrument (PBI) Between Adults and Children. *Child Psychiatry Hum Dev* 2011, 43:238-53.
 75. Klein VC, Putnam SM, Linhares MBM: Assessment of Temperament in Children: Translation of Instruments to Portuguese (Brazil) Language. *Interamerican Journal of Psychology* 2009, 43:552-557.
 76. de Lauzon-Guillain B, Wijndaele K, Clark M, Acerini CL, Hughes IA, Dunger DB, Wells JC, Ong KK: Breastfeeding and infant temperament at age three months. *PLoS One* 2012, 7:e29326.
 77. Brockington IF, Oates J, Turner D, Vostanis P, Loh C, Murdoch C: A screening questionnaire for mother-infant bonding disorders. *Arch Women Ment Health* 2001, 3:133-140.
 78. Klier CM: Mother-infant bonding disorders in patients with postnatal depression: the postpartum bonding questionnaire in clinical practice. *Arch Womens Ment Health* 2006, 9:289-291.
 79. Santos IS, Matijasevich A, Tavares BF, Barros AJ, Botelho IP, Lapolli C, Magalhaes PV, Barbosa AP, Barros FC: Validation of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) in a sample of mothers from the 2004 Pelotas birth cohort study. *Cad Saude Publica* 2007, 23:2577-2588.
 80. Korja R, Savonlahti E, Ahlqvist-Bjorkroth S, Stolt S, Haataja I, Lapinleimu H, Piha J, Lehtonen L: Maternal depression is associated with mother-infant interaction in preterm infants. *Acta Paediatr* 2008, 97:724-730.
 81. McFarlane J, Parker B, Soeken K, Bullock L: Assessing for abuse during pregnancy. Severity and frequency of injuries and associated entry into prenatal care. *JAMA* 1992, 267:3176-3178.
 82. Reichenheim ME, Moraes CL, Hasselmann MH: Semantic equivalence of the Portuguese version of the abuse assessment screen tool used for the screening of violence against pregnant women. *Rev Saude Publica* 2000, 34:610-616.
 83. Nunes MA, Ferri CP, Manzolli P, Soares RM, Drehmer M, Buss C, Giacomello A, Hoffmann JF, Ozcariz S, Melere C, et al: Nutrition, mental health and violence: from pregnancy to postpartum Cohort of women attending primary care units in Southern Brazil-ECCAGE study. *BMC Psychiatry* 2010, 10:66.
 84. Clark R: The parent-child early relational assessment: a factorial validity study. *Educ Psychol Measurement* 1999, 59:821-856.
 85. Amiel-Tison C, Barner G, Shmider SM, Levinson G, Hughes SC, Stefani SJ: A new neurologic and adaptive capacity scoring system for evaluating obstetric medications in full-term newborns. *Anesthesiology* 1982, 56:340-350.
 86. Amiel-Tison C: Update of the Amiel-Tison neurologic assessment for the term neonate or at 40 weeks corrected age. *Pediatr Neurol* 2002, 27:196-212.
 87. Riesgo RdS, Ohlweiler L, Winckler MB, Ranzan J, Riesgo IS, Rotta NT: Neurologic vigor of term newborns according to the type of delivery and obstetric maneuvers. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009, 31:279-284.
 88. Piper MC, Darrah J: Motor Assessment of the Developing Infant. Saunders Company, Philadelphia 1994, 194.
 89. Valentini NC, Sacconi R: Brazilian Validation of the Alberta Infant Motor Scale. *Phys Ther* 2012, 92:440-447.
 90. Wang TN, Howe TH, Hinojosa J, Weinberg SL: Relationship between postural control and fine motor skills in preterm infants at 6 and 12 months adjusted age. *Am J Occup Ther* 2011, 65:695-701.
 91. Cacola P, Gabbard C, Santos DC, Batista AC: Development of the affordances in the home environment for motor development-infant scale. *Pediatr Int* 2011, 53:820-825.
 92. Haydari A, Askari P, Nezhad MZ: Relationship between Affordances in the Home Environment and Motor Development in Children Age 18-42 Months. *Journal of Social Sciences* 2009, 5:319-328.
 93. Nagy E, Compagne H, Orvos H, Pal A, Molnar P, Janszky I, Loveland KA, Bardos G: Index finger movement imitation by human neonates: motivation, learning, and left-hand preference. *Pediatr Res* 2005, 58:749-753.
 94. Anisfeld M: Only tongue protrusion modelling is matched by neonates. *Dev Rev* 1996, 16:149-161.

95. Wohlschläger A, Bekkering H. Is human imitation based on a mirror-neurone system? Some behavioural evidence. *Exp Brain Res* 2002, 143:335-341.
96. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2008.
97. Novak FR, Junqueira AR, Dias Mde S, Almeida JA: Sensorial analysis of expressed human milk and its microbial load. *J Pediatr (Rio J)* 2008, 84:181-184.
98. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957, 226:497-509.
99. Skipski VP, Barclay M: Thin layer chromatography of lipids. In *Methods in Enzimolog* Volume 14. New York: Academic Press; 1969:530-598.
100. Morrison WR, Smith LM: Preparation of fatty acids methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res* 1964, 5:600-608.
101. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956, 28:350-356.
102. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25:402-408.

10.2 ANEXO II - ARTIGO PUBLICADO

Parte Experimental:

Artigo Original

Artigo enviado a revista: Plos One

Enviado: 08 de outubro de 2012.

Publicado: 16 de março de 2013.

Título: Early-Life Stress Interacts with Dietary Deficiency of Omega-3 Fatty Acids Later in Life to Increase the Metabolic Vulnerability in Adult Rats

Autores: Bernardi JR ¹; Ferreira CF ^{1,2}; Senter G ¹; Krolow R ³; de Aguiar BW ⁴; Portella AK ¹; Kauer-Sant'Anna M ⁴; Kapczinski F ⁴; Dalmaz C ^{2,3}; Goldani MZ ¹; *Silveira PP ^{1,2}.

¹ Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴ Bipolar Disorders Program & INCT Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (UFRGS), Brazil.

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

* E-mail: 00032386@ufrgs.br

Introduction

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

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

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

genes that lead to the development of diabetes mellitus type 2 in the offspring [15].

Also, it is known that nutrition throughout life also impacts long-term health. Evidence shows that diets with low content of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are involved in the development of metabolic syndrome [16], in conjunction with altered stress responses [17], behavioral patterns [17] personality traits [18], enhanced sympathetic activity [19], increased the secretion of catecholamines [20], cortisol and serotonin [21] [22]. Epidemiological and controlled clinical studies suggest beneficial effects of n-3 PUFAs consumption, both marine and plant-derived, on cardiovascular disease [23]. However, additional studies are still necessary to elucidate all the cellular and molecular mechanisms responsible for the cardiovascular and metabolic effects of n-3 PUFAs [24].

The proposal of our study was to determine if an early stressful life event, such as a neonatal maternal separation, could interact with life-long environmental factors, such as an unbalanced nutrition, and have a long-term impact on metabolic outcomes. Our hypothesis was that early stress would increase the vulnerability to the adverse metabolic effects of a chronic n-3 PUFAs deficient diet.

Materials and Methods

Subjects

Pregnant Wistar rats bred at our animal facility were randomly selected. They were single-housed in home cages made of Plexiglas (65x25x15 cm) with the floor covered with sawdust and maintained in a controlled environment (lights on between 07:00 h and 19:00 h, temperature of 22 ± 2 °C, cage cleaning once a week, food and water provided) until offspring. All litters were culled within 24 h to eight pups and were maintained intact unless for separation procedures, which were carried out between 15:30 h and 19:00 h. Included in this period were the time to set up the incubator, to bring the cages from the facility and briefly habituate the dams to the new room, to perform careful removal of the pups from the nest, the time of the separation per se, the return of the pups to the dam and, again after a brief period, to return the cage to the facility room. The researcher also changed gloves for the manipulation of each litter to avoid the spread of any kind of odor from nest to nest.

The day of birth was considered as postnatal day (PND) 0, and weaning was on PND 21. One or two male pups were used per litter per group per experiment. Rats were housed 2–3 per cage in home cages similar to those described above. Sixty two (n = 62) experimental male rats were used in the different experiments, derived from 12 different litters. Rats had free access to food (standard lab rat chow) and water, until PND 35, when the different diets (specially ordered for this study) were started (see below). We chose this age (PND 35) because other models have already explored the long term effect of n-3 PUFAs deficiency started soon after weaning [25] [26]. Aiming at investigating the human relevance and potential translational aspects of the study, we were interested in observing the effects of n-3 PUFAs deficiency starting during adolescence, a time in which humans begin to be more independent from their parents in terms of food choices.

Neonatal stress model

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

Maternal separated group (MS): pups were removed from their home cage and were placed into a clean cage lined with clean paper towel, inside an incubator at 32° C. After 3 hours, pups returned to their dams. This procedure was made in the first PND 10, after which pups were left undisturbed until PND 21.

Dietary Groups and Diets Composition

Rats were fed either adequate n-3 PUFAs (n = 29) or deficient n-3 PUFAs (n = 33) in calorically and nutritionally balanced diets, both especially manufactured for this study (PragSoluções BiociênciasH, São Paulo, Brazil) from PND 35 for 15 weeks [26]. Food consumption and body weight were measured weekly in digital balance (MarteH, AS2000C, São Paulo, Brazil) in all groups (n = 14 to 17 for each of the 4 groups). Chow consumption was measured for each cage and the calculation was done by mean consumption per animal per cage (n = number of cages = 29).

About the nutritional composition, each experimental diet contained 17.2 kJ/g of calories, 58.54% of carbohydrate, 19.51% of protein and 21.95% of crude fat (sources: coconut fat, canola oil and flaxseed oil). The densities of the oils were 90.5 g/100 ml for canola oil and 89.0 g/100 ml for flaxseed oil. The n-6/n-3 ratios were of 1.83 and 5.02 for the adequate and deficient diets, respectively [27] [28]. Table 1 show the composition and the detailed fatty acids contents of each diet (please find the measurements method described below).

Abdominal Fat Dissection and Tissue Collection

Rats were decapitated between 13:00 h and 16:00 h in a random order using a small animal guillotine (InsightH EB271, São Paulo, Brazil) after 6 h of fasting. Trunk blood was collected and an aliquot of whole blood was stored. After centrifugation (3000 rpm, 15 min), serum and plasma were also stored at -80°C until glucose, total cholesterol, triglycerides (TGs), insulin and leptin determination. A small portion of the liver, as well as the whole brain were quickly removed, flash frozen in isopentane and the samples were stored at -80°C until processing. The two major portions of abdominal fat (gonadal and retroperitoneal adipose tissue depots) were dissected and weighed.

Detailed dietary fatty acid composition and peripheral blood fatty acids determination

Dietary fat was extracted with chloroform-methanol [29]. Aliquots (2–3 ml) of the chloroform lipid extract were evaporated at 50°C using a vacuum pump, followed by saponification in methanolic KOH solution and esterification in methanolic H₂SO₄ solution [30].

Fatty acids in blood were esterified and extracted using a one-step reaction [31] with some modification. Blood (100 ml) was mixed with 2 ml methanol/isooctane (4:1, v/v) and 200 ml acetyl chloride and was incubated at 100°C for 60 min; then 60 g/l aqueous potassium carbonate containing 100 g/l sodium chloride was added. The mixture was shaken for 10 min at room temperature and centrifuged at 1,800 g for 5 min, to obtain the isooctane phase, containing the fatty acid methyl esters.

The esterified samples were analyzed using an Agilent Technologies gas chromatograph (HP 6890) fitted with a Supelco SP-2560 capillary column (100 m±0.25 mm±0.20 mm) and flame ionization detection. The temperature of the injector port and the detector was set at 250°C, and the carrier gas was nitrogen (1.0 ml/min). After injection (1 ml, split ratio 50:1), the oven temperature was held at 140°C for 3 min, increased to 170°C at a rate of 6°C min⁻¹, and hold at this temperature for 2 min, increased to 185°C at a rate of 3°C min⁻¹, and hold at this

Table 1. Diets composition.

Ingredients (in g)	n-3 PUFAs adequate (for 1000 g)	n-3 PUFAs deficient (for 1000 g)
Isolated Soy Protein	200	200
Dextrose	200	200
Maltodextrin	150	150
Corn starch	150	150
Sucrose	100	100
Coconut fat	60	66
Canola oil	32	34
Flaxseed oil	8	0
Microcrystalline cellulose	50	50
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
Chlorine chloride	2.5	2.5
L-cystine	2.5	2.5
Butylated hydroxytoluene (BHT)	0.0	0.0
Fatty acid composition (% of the total fatty acids content)		
8:0	1.0	1.2
10:0	1.3	1.6
12:0	21.4	23.7
14:0	11.6	12.4
15:0	0.0	0.0
16:0	8.9	9.1
16:1 n-7	0.1	0.1
17:0	0.1	0.1
18:0	4.1	3.9
18:1 n-9	30.9	31.5
18:1 n-7	1.6	1.6
18:2 n-6	11.2	10.9
20:0	0.4	0.4
18:3 n-6	0.3	0.3
20:1 n-9	0.7	0.7
18:3 n-3	6.3	2.2
20:2 n-6	0.0	0.0
24:0	0.2	0.2
24:1 n-9	0.1	0.1

temperature for 6 min, and then increased to 240°C at a rate of 3°C min⁻¹, and hold at this temperature for 7 min. Standard fatty acid methyl esters (37-component FAME Mix, DPA n-3 and PUFA no. 2 from Sigma, Saint Louis, MO, USA and DPA n-6 from NuChek Prep, Inc., Elysian, MN, USA) were run under the same conditions and the subsequent retention times were used to identify the fatty acids. Fatty acids were expressed as percentage of the total fatty acids content.

Biochemical Analysis

The biochemical parameters were measured in a representative subsample of 30 rats because after the 15 weeks of the exposure to the diets, the other animals (n = 32) were subjected to behavioral tasks planned in the project but not related to metabolic outcomes reported in this study. As behavioral testing could affect the metabolic results, we decided not to include these animals in the

biochemical measurements. Plasma glucose, plasma cholesterol (total and HDL, LDL was calculated) and plasma TGs were measured using commercial kits (Wiener lab GroupH, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Serum insulin and serum leptin were measured using commercially available ELISA kits (MilliporeH, EZRMI-13K, Missouri, USA and InvitrogenH, KRC2281, California, USA, respectively). The HOMA index was calculated as the product of the fasting plasma insulin and glucose levels divided by 22.5 [32]. The whole hypothalamus was dissected from the brain at -20°C, the samples were homogenized in Nuclear Extraction Buffer I (NEB1-10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, pH 7.9) with a protease inhibitor (100:1). Then, a detergent (NP40 1%) was added and the homogenate was centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant (cytosolic fraction) was used for posterior NPY quantification using a commercially available

peptide enzyme immunoassay kit (Peninsula Laboratories LCC, California, USA).

Real-time quantitative PCR

For gene expression assays, PECK expression, total RNA was extracted from liver using TRI Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured with NanoDropH ND-1000 (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA). It is well established that the ratios of absorbencies at 260 nm and 280 nm and 260 nm and 230 nm is used to assess the purity of RNA. All samples were analyzed and the ratios approximately at 2.0 and 2.0–2.2, respectively, were accepted as pure RNA. The selection of GAPDH as an endogenous control was based on several studies that demonstrate the efficiency of its expression in rat liver [33] [34] [35]. Although a pool of different internal controls wasn't performed, the GAPDH expression did not vary between the samples tested, justifying its use.

All reactions were performed in triplicates with the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). One microgram of total RNA was reverse-transcribed to cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (P/N: 4368814, Applied Biosystems, CA, USA) following the manufacturer's protocol and cDNA was stored at 280°C until real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. All cDNAs were diluted 1:10 before being used as PCR template. The dilution was chosen after standard curve was performed. Specific primer pairs and TaqMan MGB probe labeled with FAM for Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Rn 01529014_m1, Applied Biosystems) were used. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers and probe (43523388E, Applied Biosystems) labeled with VIC were used as endogenous control. Relative expression levels were determined by the ddCt method [36].

Statistical Analyses

Data were expressed as Mean values \pm SEM (Standard Error of the Mean) and analyzed by Student's t Test, two-way or repeated measures analysis of variance (ANOVA), followed by LSD post hoc test, when indicated. Data on PEPCK gene expression had no normal distribution and therefore it was log transformed for analysis. Pearson correlations were performed between the different fatty acids levels and different outcomes. Significance levels for all measures were set at $p \neq 0.05$. SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS Inc, Chicago, IL) version 18.0 was used for the statistical analysis.

Ethical Aspects

All animal treatments were approved by the Institutional Ethical Committee (Ethical Committee, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, with number 09-410) and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). All efforts were taken to minimize pain or discomfort.

Results

Body Weight Gain and Food Consumption

MS was associated with increased body weight already at ages PND 21 (NH 36.09 \pm 1.08; MS 40.07 \pm 0.96), PND 28 (NH 65.60 \pm 1.71; MS 70.92 \pm 1.43) and PND 35 (NH 105.90 \pm 2.30; MS 112.81 \pm 1.83), before the exposure to the adequate or deficient diets (Student's t Test, $t(60) = 2.742$, $p = 0.008$; $t(60) = 2.366$, $p = 0.021$ and $t(60) = 2.327$, $p = 0.023$, respectively).

There was an effect of group, where maternal separated (MS) rats had more weight gain [Repeated Measures ANOVA, $F(1,58) = 6.719$, $p = 0.012$] and food consumption [$F(1,25) = 4.345$, $p = 0.047$] than the NH group, without interactions [$F(1,58) = 0.009$, $p = 0.926$ for weight, $F(1,25) = 0.273$, $p = 0.606$ for food intake]. It is important to mention for comparison that in our animal facility, the mean body weight of 5 month old Wistar rats fed with standard chow attain between 330 g and 370 g. There were no diet effects in body weight [$F(1,58) = 2.815$, $p = 0.099$] or food consumption [$F(1,25) = 1.418$, $p = 0.245$]. Figures 1 and 2 display these results, respectively.

Abdominal Fat

Abdominal fat deposition is expressed in percentage of body weight of each rat. The MS group had more abdominal fat deposition [Two-Way ANOVA, $F(1,61) = 35.378$, $p < 0.001$] than NH group, without effect of the diets [$F(1,61) = 0.097$, $p = 0.756$] or interaction [$F(1,61) = 0.327$, $p = 0.570$]. Figure 3 displays these results.

Biochemical Analysis

Results from biochemical measurements are shown in Table 2. The MS group had increased plasma triglycerides [Two-Way ANOVA, $F(1,29) = 6.403$, $p = 0.018$] when compared to the NH group, without effect of the diet [$F(1,29) = 0.707$, $p = 0.408$] and no interaction [$F(1,29) = 1.212$, $p = 0.281$]. There was no difference in plasma glucose [$F(1,29) = 1.071$, $p = 0.310$], total cholesterol [$F(1,29) = 2.142$, $p = 0.155$], LDL [$F(1,28) = 3.731$, $p = 0.065$] and HDL [$F(1,28) = 0.022$, $p = 0.882$] between groups and no effects of the diet [$F(1,29) = 0.473$, $p = 0.497$; $F(1,29) = 2.895$, $p = 0.101$, $F(1,28) = 0.768$, $p = 0.389$ and $F(1,28) = 0.008$, $p = 0.931$ respectively], and no interactions [$F(1,29) = 0.151$, $p = 0.701$; $F(1,29) = 0.686$, $p = 0.415$; $F(1,28) = 0.024$, $p = 0.878$ and $F(1,28) = 0.011$, $p = 0.917$ respectively]. The hypothalamic content of NPY was also no different among the groups [$F(1,24) = 0.288$, $p = 0.597$] and diets [$F(1,24) = 0.022$, $p = 0.884$], with no interactions [$F(1,24) = 0.433$, $p = 0.518$].

There was an interaction between the MS group and the diet exposure in serum insulin [$F(1,29) = 5.083$, $p = 0.033$], in which MS_deficient animals were different from MS_adequate (post hoc LSD, $p = 0.013$) and NH_deficient ($p = 0.022$) whereas the difference from NH_adequate did not reach statistical significance ($p = 0.078$). An interaction was also seen for HOMA index [$F(1,29) = 4.276$, $p = 0.049$], in which the pattern is similar ($p = 0.023$, $p = 0.022$ and $p = 0.075$ for the difference between MS_deficient and MS_adequate, NH_deficient and NH_adequate, respectively). No isolated effects of group [$F(1,29) = 1.143$, $p = 0.295$ for insulin; $F(1,29) = 1.619$; $p = 0.214$ for HOMA index] or diet [$F(1,29) = 2.320$, $p = 0.140$ for insulin; $F(1,29) = 1.816$, $p = 0.189$ for HOMA index] were found for these outcomes.

Serum leptin [$F(1,28) = 7.840$, $p = 0.010$] also demonstrated an interaction, in which MS_deficient animals were different from NH_adequate (post hoc LSD, $p = 0.037$) and NH_deficient ($p = 0.001$) whereas the difference from MS_adequate did not reach statistical significance ($p = 0.160$). Liver PEPCK gene expression followed the same pattern of interaction [$F(1,24) = 4.239$, $p = 0.050$], but the multiple comparisons was not able to detect the differences. No isolated effects of diet [$F(1,28) = 0.202$, $p = 0.657$ for leptin and $F(1,24) = 0.114$, $p = 0.739$ for PEPCK] was found for these outcomes, and while no isolated effect of the group was found for PEPCK [$F(1,24) = 0.509$, $p = 0.484$] an effect of group on leptin levels [$F(1,28) = 16.175$, $p < 0.0001$], which disappears after adjusting the ANOVA for the abdominal fat deposition (% of body weight), while the interaction

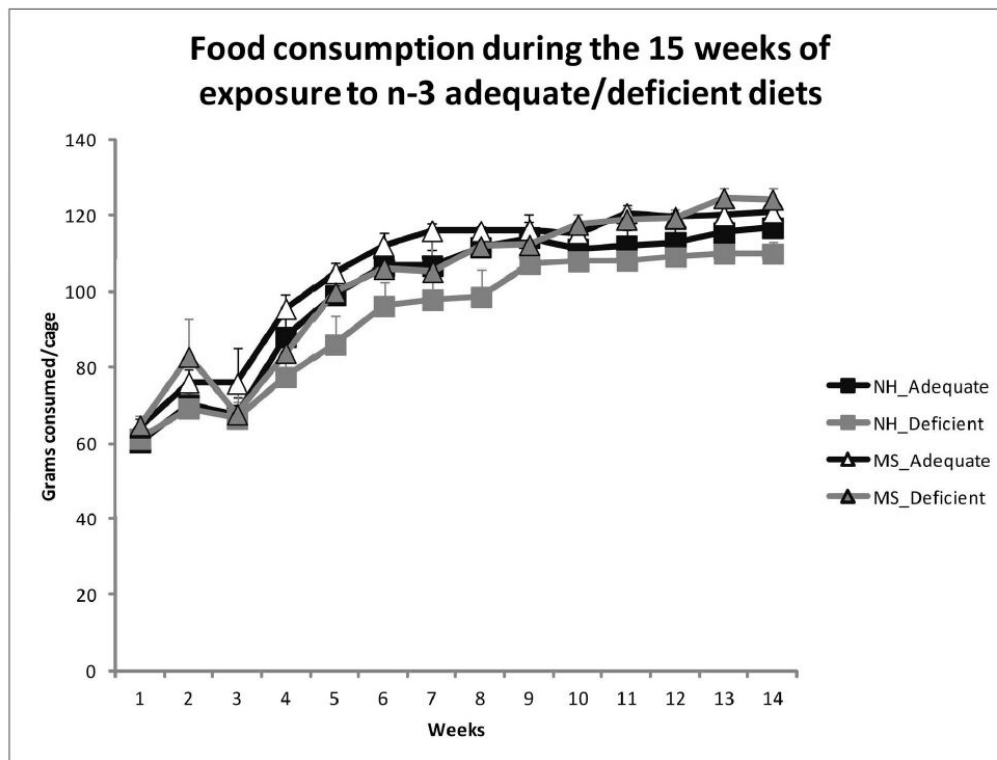


Figure 1. Mean \pm SEM of the weekly chow consumption (mean consumption per cage) during the 15 weeks period of chronic exposure to the diets (from PND 35). Maternal separated (MS) rats had increased food consumption in comparison to the non-handled (NH) ones (Repeated Measures ANOVA, $p=0.047$). There was no effect of the diets on the food consumption ($p=0.245$), or interaction (MS_adequate group = 6 cages; MS_deficient group = 6 cages; NH_adequate group = 7 cages; NH_deficient group = 10 cages).

group \times diet remains significant [$F(1,28) = 0.923$, $p = 0.346$ for group; $F(1,28) = 0.558$, $p = 0.462$ for diet and $F(1,28) = 5.416$, $p = 0.029$ for the interaction]. These results were displayed in Table 2.

Peripheral blood fatty acids determination

Two ANOVAs were performed to analyze the peripheral blood fatty acids. There was an interaction between the MS group and the diet in the peripheral levels of the 16:1 n-7 fatty acid [$F(1,16) = 5.703$, $p = 0.030$], in which MS_deficient rats had increased levels in comparison to NH_deficient rats (post hoc LSD, $p = 0.034$). There were no isolated effects of group [$F(1,16) = 0.802$, $p = 0.384$] or diet [$F(1,16) = 0.003$, $p = 0.957$] for this fatty acid.

An interaction was also seen in the peripheral levels of the 18:3 n-3 fatty acid [$F(1,16) = 5.828$, $p = 0.028$], in which NH_deficient rats had decreased levels when compared to NH_adequate (post hoc LSD, $p = 0.007$), but also when compared to MS_deficient (post hoc LSD, $p = 0.044$) rats; the other group comparisons were not significant. There were no isolated effects of group [$F(1,16) = 0.450$, $p = 0.512$] or diet [$F(1,16) = 3.664$, $p = 0.074$] for this fatty acid.

An isolated effect of the diet was seen in the peripheral levels of the 22:6 n-3 fatty acid (DHA) [$F(1,16) = 5.161$, $p = 0.037$], sum of

saturated fatty acid [$F(1,16) = 4.594$, $p = 0.048$], and total n-6 PUFAs [$F(1,16) = 14.707$, $p = 0.001$], in which rats receiving the deficient diet had increased peripheral DHA levels and total n-6 PUFAs and decreased saturated fatty acids. There were no isolated effects of group in DHA [$F(1,16) = 0.980$, $p = 0.337$]; saturated fatty acids [$F(1,16) = 1.000$, $p = 0.332$] and n-6 PUFAs [$F(1,16) = 0.617$, $p = 0.443$]; or interaction in DHA [$F(1,16) = 1.328$, $p = 0.266$]; saturated fatty acids [$F(1,16) = 1.612$, $p = 0.222$] and n-6 PUFAs [$F(1,16) = 0.000$, $p = 0.999$]; for this fatty acid. Despite that, there were no differences in total n-3 PUFAs [$F(1,16) = 0.111$, $p = 0.744$ for group, $F(1,16) = 0.782$, $p = 0.390$ for diet and $F(1,16) = 0.385$, $p = 0.544$ for the interaction] or in the omega 3 index (EPA-Eicosapentaenoic acid + DHA) [$F(1,16) = 0.537$, $p = 0.537$ for group, $F(1,16) = 0.245$, $p = 0.627$ for diet and $F(1,16) = 0.270$, $p = 0.871$ for the interaction] between the groups.

No other differences or isolated effects were observed (Table 3). However, negative correlations between the peripheral levels of 18:0 (stearic acid) and HOMA index ($r = -0.553$, $p = 0.014$), insulin ($r = -0.920$, $p = 0.027$) and triglycerides levels ($r = -0.580$, $p = 0.009$). Besides that, the peripheral levels of 16:1 n-7 (palmitoleic acid) correlate positively with the abdominal fat deposition (as a percent of body weight) ($r = 0.486$, $p = 0.035$).

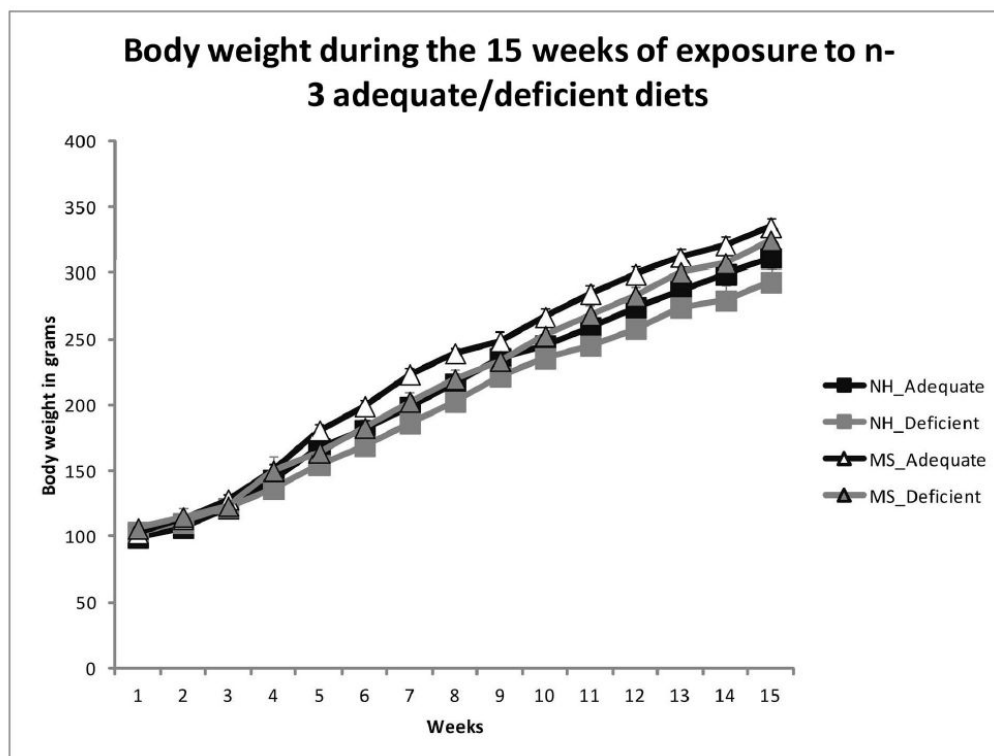


Figure 2. Mean \pm SEM of the weekly body weight measurements during the 15 weeks period of chronic exposure to the diets (from PND 35). Maternal separated (MS) rats had increased body weight in comparison to the non-handled (NH) ones (Repeated Measures ANOVA, $p=0.012$). There was no effect of the diets on the body weight ($p=0.099$), or interaction.

Discussion

In this study, maternal separation stress was associated with increased weight gain, food consumption, abdominal fat and plasma triglycerides in adult rats. In addition, the chronic exposure to a mild deficiency in dietary n-3 PUFAs potentiates the vulnerability conferred by the neonatal stress, leading to insulin resistance and altered leptin, as well as specific alterations in the peripheral fatty acids profile.

We showed that maternal separation stress is associated with higher body weight that can be detected at weaning (before the exposure to the dietary deficiency in n-3 PUFAs), as well as increased food intake and abdominal fat, irrespective to the diet treatment. Interestingly, the food intake pattern from week 1 to 3 is broken in all groups by a sudden increased food intake during the second week of the diet exposure. Others have shown a similar irregularity during the first food intake measurements when changing the type of diet and/or the dietary fat content [37], and this is possibly related to the rats' adaptation to the new food.

Regarding the early intervention model, studies suggests that neonatal maternal separation can lead to the development of eating disorders, especially when the animal is challenged with other social or metabolic stressors later in life [2]. The resulting positive energy balance, especially in an animal known to have a maladaptive response to stress [5], with amplification of glucocorticoid action, is probably playing an important role in the

development of the central abdominal obesity [38] that we described in this group. The increased abdominal fat is suggested as a marker of 'dysfunctional adipose tissue' [39], leading to altered free fatty acids metabolism, and hypertriglyceridemia as we saw in maternally separated animals. The resulting increased free fatty acids flux to the liver impairs liver metabolism [40], leading to increased hepatic insulin resistance [41]. As n-3 PUFAs are potent inhibitors of hepatic glycolysis and de novo lipogenesis, through the inhibition of genes involved in glucose utilization and lipid synthesis, including L-pyruvate kinase, fatty acid synthase, and acetyl-CoA carboxylase [42], a dietary deficiency in this nutrient would exacerbate hepatic fatty acid synthesis and storage [43], and therefore liver lipotoxicity [40].

The increased hepatic insulin resistance decreases the ability of insulin to downregulate PEPCK gene expression as we saw in the MS, n-3 PUFAs deficient rats [44] [45]. This impairs the shutdown of liver glucose production and consequently increases the need of insulin production to maintain a normal glycemia. We could consider this "effort" as an indicative of increased allostatic load in this group [46].

As insulin is one of the major regulators of leptin levels [47] [48], the increased peripheral insulin reported here could explain the altered levels of leptin described in maternally separated, n-3 PUFAs deficient rats. Strikingly, despite the higher circulating levels of the anorexigenic cytokine leptin, maternally separated rats

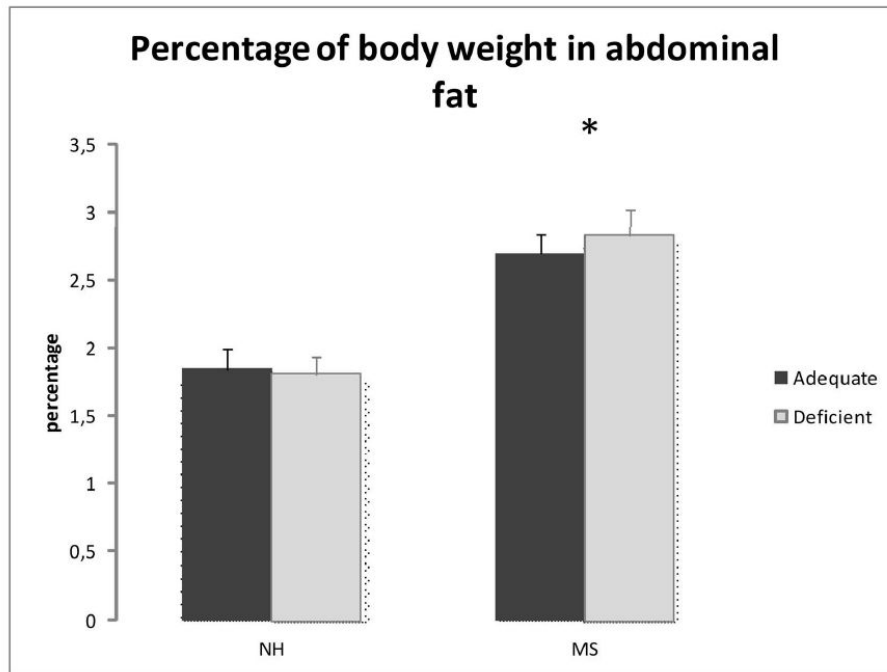


Figure 3. Abdominal fat [(sum of gonadal and retroperitoneal depots' weight in grams)*100/total body weight in grams)]. Maternal separated (MS) rats had increased abdominal fat deposition in comparison to the non-handled (NH) ones (*Two-Way ANOVA, $p_{\text{MS}} < 0.001$) without effect of the diets ($p = 0.756$) or interaction.

still had increased food intake, which was also not explained by differences in hypothalamic NPY (a neuropeptide that plays a major role stimulating appetite). Another study reports an increased NPY mRNA level only after 48 h of food deprivation in MS females, but no differences in the basal arcuate expression

levels of this peptide [49]. This result agrees with our study, in the sense that hypothalamic NPY levels do not appear to respond to peripheral signals of energy homeostasis in MS animals in the same way that NH animals would do. Since leptin is known to decrease NPY release [50], the absence of effect on this peptide

Table 2. Mean \pm SEM for biochemical measurements.

Groups	Non-handled		Maternal Separation	
	Adequate n = 7	Deficient n = 8	Adequate n = 7	Deficient n = 8
Diets				
Glucose (mg%)	100.7 \pm 4.5	99.5 \pm 4.0	106.5 \pm 4.2	102.1 \pm 3.6
Total cholesterol (mg%)	60.9 \pm 1.8	63.3 \pm 2.9	54.8 \pm 2.0	61.6 \pm 3.2
HDL (mg/dl)	25.5 \pm 1.5	24.7 \pm 2.6	24.6 \pm 3.5	24.6 \pm 4.8
LDL (mg/dl)	21.5 \pm 2.8	26.1 \pm 3.7	13.8 \pm 2.4	16.9 \pm 6.5
Triglycerides (%mg)*	69.6 \pm 5.2	67.2 \pm 5.8	82.5 \pm 11.3	99.9 \pm 11.5
Insulin (ng/mL)**	1.8 \pm 0.1 ^{a,b}	1.6 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.3 ^b	2.6 \pm 0.5 ^a
Leptin (pg/mL)**	2442.6 \pm 379.4 ^b	1445.1 \pm 115.8 ^b	2819.1 \pm 265.2 ^{a,b}	3541.4 \pm 365.8 ^a
HOMA index**	0.5 \pm 0.1 ^{a,b}	0.4 \pm 0.1 ^b	0.4 \pm 0.1 ^b	0.7 \pm 0.1 ^a
Liver PEPCK mRNA (% RQ values of NH_adequate group)**	100.0 \pm 9.0	78.9 \pm 9.0	75.7 \pm 9.8	89.5 \pm 7.8
Hypothalamic NPY(ng/mg)	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2	1.7 \pm 0.3	1.6 \pm 0.1

Different letters mean statistical significant differences in the multiple comparisons (LSD test).

*Two-Way ANOVA: Effect of the Maternal Separation, $p_{\text{MS}} = 0.05$.

**Two-Way ANOVA: Interaction Maternal Separation x Diet, $p_{\text{MS}} = 0.05$.

Table 3. Mean \pm SEM peripheral blood fatty acid composition in non-handled and maternal separated male rats fed adequate or n-3 PUFAs deficient diets.

Group Diets	Non-handled		Maternal Separated		p Value		
	Adequate (mg/100 mg fatty acid)	Deficient (mg/100 mg fatty acid)	Adequate (mg/100 mg fatty acid)	Deficient (mg/100 mg fatty acid)	Group	Diet	Interaction
12:0	0.5 \pm 0.6	0.4 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	0.9 \pm 0.7	0.060	0.539	0.788
14:0	0.8 \pm 0.6	0.5 \pm 0.4	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	0.563	0.388	0.474
16:0	24.2 \pm 2.1	25.0 \pm 0.3	24.2 \pm 2.0	23.1 \pm 1.4	0.209	0.846	0.181
16:1 n-7	0.4 \pm 0.5 ^{ab}	0.0 \pm 0.0 ^b	0.2 \pm 0.3 ^{ab}	0.6 \pm 0.6 ^a	0.384	0.957	0.030
17:0	0.2 \pm 0.3	0.4 \pm 0.4	0.2 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3	0.369	0.369	0.640
18:0	18.3 \pm 2.2	18.2 \pm 0.9	19.1 \pm 1.7	16.8 \pm 2.5	0.708	0.178	0.210
18:1 n-9	13.9 \pm 2.0	14.0 \pm 0.6	15.2 \pm 1.7	16.3 \pm 3.1	0.063	0.527	0.551
18:1 n-7	1.7 \pm 0.5	1.9 \pm 0.2	1.9 \pm 0.4	2.2 \pm 0.3	0.213	0.142	0.713
18:2 n-6	11.1 \pm 1.6	11.7 \pm 1.6	11.3 \pm 1.5	13.6 \pm 2.5	0.206	0.092	0.311
20:1 n-9	0.1 \pm 0.2	0.3 \pm 0.5	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.3	0.620	0.164	0.894
18:3 n-3	0.8 \pm 0.3 ^b	0.1 \pm 0.2 ^a	0.5 \pm 0.4 ^{ab}	0.6 \pm 0.5 ^b	0.512	0.074	0.028
22:0	0.7 \pm 0.7	0.2 \pm 0.5	0.4 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.723	0.375	0.404
20:3 n-6	1.0 \pm 0.8	1.2 \pm 0.8	0.7 \pm 0.7	0.7 \pm 0.7	0.261	0.759	0.791
20:3 n-3	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.3	0.3 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	0.975	0.264	0.431
20:4 n-6	11.8 \pm 1.0	13.9 \pm 1.4	11.3 \pm 2.1	11.8 \pm 3.0	0.174	0.172	0.405
24:0	3.8 \pm 1.9	2.6 \pm 1.7	3.3 \pm 1.9	2.9 \pm 1.8	0.906	0.352	0.620
20:5 n-3	1.2 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0	0.7 \pm 1.0	0.6 \pm 0.9	0.909	0.075	0.112
24:1 n-9	3.7 \pm 1.2	3.3 \pm 0.4	3.5 \pm 1.0	2.7 \pm 1.4	0.397	0.173	0.723
22:5 n-3	1.7 \pm 0.4	1.0 \pm 0.7	1.5 \pm 0.9	1.1 \pm 0.8	0.935	0.099	0.605
22:6 n-3	2.7 \pm 0.6 ^a	4.1 \pm 1.6 ^b	2.8 \pm 0.4 ^a	3.2 \pm 0.7 ^b	0.337	0.037	0.266
Saturated	48.5 \pm 3.5 ^a	47.4 \pm 1.2 ^b	48.8 \pm 2.7 ^a	44.7 \pm 2.8 ^b	0.332	0.048	0.222
Monounsaturated	20.0 \pm 2.4	19.5 \pm 0.8	20.8 \pm 1.1	22.0 \pm 2.7	0.065	0.680	0.335
n-3 PUFAs	6.7 \pm 1.4	5.4 \pm 2.0	5.8 \pm 2.0	5.6 \pm 2.2	0.744	0.390	0.544
n-6 PUFAs	23.9 \pm 1.9 ^a	26.8 \pm 0.9 ^b	23.4 \pm 2.2 ^a	26.2 \pm 1.4 ^b	0.443	0.001	0.999
n-6/n-3 ratio	3.7 \pm 0.6	5.6 \pm 2.0	4.5 \pm 1.9	5.4 \pm 2.4	0.734	0.112	0.576

Different letters mean statistical significant differences in the multiple comparisons (LSD) test.

levels could be interpreted as a sign of hypothalamic leptin resistance in the maternally separated, n-3 PUFAs deficient rats.

A study evaluating the effects of dietary flaxseed, a lipid rich in n-3 PUFAs showed no difference in weight gain, food consumption and caloric efficiency in rats. However, there was significant decrease in blood glucose, total cholesterol and triglycerides in animals that received flaxseed when compared to animals that received standard food [51]. Our study did not show differences in blood glucose or cholesterol, while triglycerides were affected mainly by the neonatal intervention. Other studies describe that a dietary deprivation of n-3 PUFAs for no more than 3 months is sufficient to cause a severe depletion of these fatty acids in both liver phospholipids and triglycerides [52] and induces features of the metabolic syndrome, including liver steatosis, visceral obesity and insulin resistance [53] [54]. In our study, these effects were seen only in neonatally stressed rats, not in NH group. In other words, maternal separation conferred an increased vulnerability to the metabolic effects of the dietary n-3 PUFAs deficiency in our study.

Other authors have reported that the MS procedure leads to a significant reduction in total plasma n-3 PUFAs concentrations (including α -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, docosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in comparison to controls. We did not find differences in the peripheral levels of n-3 PUFAs in our study, and the deficient diet induced a reduction in peripheral α -linolenic acid only in NH animals. It is possible that the MS group was already functioning at its lowest biological limit (assuming that the lowest biological limit is higher for the MS group), and was unresponsive to the deficiency in our study. Another possibility is that we are observing more the effects of the early-life stress itself, rather than a diet X stress interaction per se in this result.

Interestingly, animals exposed to MS and to the dietary deficiency in n-3 PUFAs demonstrated increased palmitoleic acid in our study. Palmitoleic acid is associated with increased insulin concentrations [55] and resistance [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62], type II diabetes [63] [64], metabolic syndrome [61] [65] [66], heart failure [67] and coronary heart disease [68]. Plasma palmitoleic acid content is an independent marker of both triglyceridemia and abdominal adiposity in men [62] [69], which agrees with the positive correlation between this fatty acid peripheral level and the amount of abdominal fat deposition found in this study. In addition, it has been shown to induce hepatic steatosis and increase fatty acid synthase expression in mice [70], corroborating to the idea of hepatic lipotoxicity in MS deficient animals, as discussed above. Our findings also agree with the literature regarding the negative correlations between stearic acid and HOMA index as well as insulin levels [58] [63].

Despite the fact that the n-3 PUFAs deficient diet used in this study ultimately increased the peripheral levels of DHA, the groups had no difference in other n-3 PUFAs indices such as the Omega-3 Index and total n-3 PUFAs in blood. One possible explanation for the increased peripheral DHA levels is based on the very mild deficiency imposed by the diet that we used. A study using different dietary content of α -linolenic acid demonstrates that, at such level of deficiency, DHA in plasma was not affected by the diet [71]. Another study shows that DHA levels decrease more slowly than EPA subsequent to n-3 PUFAs reduction, indicating some type of docosahexaenoic acid retention [72]. In the serum, the effects of a low n-3 PUFAs diet are less severe than in other tissues [73]. In addition, it seems that the blood compartmental metabolism of DHA differs substantially depending on the type of the diet, both in terms of bioavailability in plasma and accumulation in target tissues [74]. As plasma and

erythrocyte EPA, DHA, Omega-3 Index and total n-3 PUFAs have weaker correlations with the corresponding fatty acid content in the brain compared with other tissues [75], the animals receiving the deficient diet in our study could still be experiencing low levels of essential n-3 PUFAs in target tissues, especially the brain, and this could explain the metabolic effects seen especially in the MS group. Finally, our deficient diet is more closely related to mild n-3 PUFAs deficiencies that can be easily found in human populations, therefore one could argue that our results have the potential of being more readily translatable to the human conditions. The modern Western diet can reach n-6/n-3 ratio as high as 30:1, when the desirable vary between 2:1 to 5:1 [76]. The ratio in our deficient diet was 5:1 - again, a mild deficiency. This is of added significance to our findings, considering that possibly the interactions between early life stress and nutritional deficiency in n-3 PUFAs could have impacted even more the metabolic outcomes if the dietary deficiency imposed were to be more intense. It remains to be established to what extend our findings are applicable to humans, however the fact that any adult could be experiencing the same or worse levels of dietary deficiency as the one imposed by our model, is certainly of interest. It is interesting to highlight that neonatal stress interacted with the chronic n-3 PUFAs deficiency increasing the metabolic vulnerability. Other reports using a similar design demonstrated that maternal separation interacts with dietary n-3 PUFAs deprivation increasing the depressive-like response, reward response and impulsivity [26], being associated with more anxiety and fearful responses in inescapable situations, while their ability to cope with an aversive avoidance task remains unaffected [25]. In humans, several studies show that metabolic syndrome often is co morbid with major depression (just to cite recent ones: [77] [78] in a bidirectional association [79]).

Recently, a resting-state functional magnetic resonance brain imaging study [80] demonstrated that alterations in the ventral striatum connectivity mediate the relationship between HOMA index and symptoms of depressed mood. This study supports the notion that functional alterations in reward circuits vary directly with the insulin resistance levels across individuals. In addition, the role of n-3 PUFAs in mood disorders has been extensively (reviews in [81] [82] [83]). Therefore, it is possible that the insulin resistance reported in our study, in maternally separated/n-3 PUFAs deficient rats, plays a role in explaining the behavioral alterations described by [26]. It would be interesting to determine whether a diet supplemented with n-3 PUFAs might have a protective influence in MS rats, therefore future studies are warranted.

In summary, we showed that maternal separation leads to increased food intake and weight gain and its related metabolic consequences such as abdominal fat deposition and increased triglycerides. To the best of our knowledge, this is the first report describing the metabolic consequences of disruptions in the mother-pup interaction using this model. In humans, it was recently shown that the risk for overweight at age 9–11 years is elevated among children whose mothers had experienced distress in the postnatal period [84]. In addition, we observed here that a mild dietary deficiency in n-3 PUFAs increases some of the metabolic consequences of maternal separation, leading to insulin and leptin resistance, and this is associated with alterations in the peripheral fatty acid profile in MS deficient animals, such as increased palmitoleic acid. Studies addressing if variations in the vulnerability to subtle nutritional variations also exist in humans may be relevant for primary prevention of prevalent conditions such as obesity and the metabolic syndrome, especially in populations exposed to early life stress.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRB CFF PPS. Performed the experiments: JRB CFF GS PPS. Analyzed the data: JRB CFF GS RK

BWA AKP MK FK CD MZG PPS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JRB CFF GS RK BWA AKP MK FK CD MZG PPS. Wrote the paper: JRB CFF GS RK BWA AKP MK FK CD MZG PPS.

References

- Clarke G, O'Mahony SM, Hennessy AA, Ross P, Stanton C, et al. (2009) Chain reactions: early-life stress alters the metabolic profile of plasma polyunsaturated fatty acids in adulthood. *Behav Brain Res* 205: 319–321.
- Jahng JW (2011) An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Horm Behav* 59: 213–220.
- Kuhn CM, Butler SR, Schanberg SM (1978) Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science* 201: 1034–1036.
- Kuhn CM, Pank J, Schanberg SM (1990) Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev Psychobiol* 23: 395–410.
- Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 195–200.
- Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, et al. (2007) Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* 58: 32–39.
- George ED, Bordner KA, Elwafi HM, Simen AA (2010) Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neurosci* 11: 123.
- Diehl LA, Silveira PP, Leite MC, Crema LM, Portella AK, et al. (2007) Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Res* 1144: 107–116.
- Vanitallie TB (2002) Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism* 51: 40–45.
- Seckl JR (2004) Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 3: U49–62.
- Gluckman PD, Hanson MA (2004) The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 15: 183–187.
- Clark PM (1998) Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the fetal origins of adult disease hypothesis. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 1: S7–10.
- Rkhzay-Jaf J, O'Dowd JF, Stocker CJ (2012) Maternal Obesity and the Fetal Origins of the Metabolic Syndrome. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 6: 487–495.
- Kaufman D, Banerji MA, Shorman I, Smith EL, Coplan JD, et al. (2007) Early-life stress and the development of obesity and insulin resistance in juvenile bonnet macaques. *Diabetes* 56: 1382–1386.
- Kamel M (2012) Prenatal Effects of Different Intra-Uterine Milieus on Fetal Glucose Sensing Mechanisms during Gestation in Rats. *J Diabetes Metab* 3: 181.
- Agostoni C (2010) Docosahexaenoic acid (DHA): from the maternal-fetal dyad to the complementary feeding period. *Early Hum Dev* 86 Suppl 1: 3–6.
- Reynolds RM (2013) Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: Two decades of testing the hypothesis – 2012 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* 38:1.
- Sutin AR, Costa PT, Jr., Uda M, Ferrucci L, Schlessinger D, et al. (2010) Personality and metabolic syndrome. *Age (Dordr)* 32: 513–519.
- Straznicki NE, Eikelis N, Lambert EA, Esler MD (2008) Mediators of sympathetic activation in metabolic syndrome obesity. *Curr Hypertens Rep* 10: 440–447.
- De Pergola G, Giorgino F, Benigno R, Guida P, Giorgino R (2008) Independent influence of insulin, catecholamines, and thyroid hormones on metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2405–2411.
- Zhou L, Sutton GM, Rochford JJ, Sempke RK, Lam DD, et al. (2007) Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signaling pathways. *Cell Metab* 6: 398–405.
- Singh RB, Pella D, Mechurova V, Otsuka K (2004) Can brain dysfunction be a predisposing factor for metabolic syndrome? *Biomed Pharmacother* 58 Suppl 1: S56–68.
- Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM (2006) n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83: 1526S–1535S.
- Raposo H (2010) Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. *Rev. Nutr. [online]* 23: 871–879.
- Mathieu G, Oualian C, Denis I, Lavielle M, Gisquet-Verrier P, et al. (2011) 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* 85: 129–136.
- Mathieu G, Denis S, Lavielle M, Vancassel S (2008) Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78: 391–401.
- Hibbeln JR, Nieminen LR, Blasbalg TL, Riggs JA, Lands WE (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr* 83: 1483S–1493S.
- Dupont JL (2009) Research in the Agricultural Research Service/USDA: introduction and early history. *J Nutr* 139: 171–172.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917.
- Hartman L, Lago RC (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 22: 475–476.
- Lepage G, Roy CC (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27: 114–120.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412–419.
- Soyalan B, Minn J, Schmitz HJ, Schrenk D, Will F, et al. (2011) Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver. *Eur J Nutr* 50: 135–143.
- Pfaffl MW, Windisch W (2003) Influence of zinc deficiency on the mRNA expression of zinc transporters in adult rats. *J Trace Elem Med Biol* 17: 97–106.
- Kang J, Holland M, Jones H, Kaysen GA (1999) Coordinate augmentation in expression of genes encoding transcription factors and liver secretory proteins in hypo-oncotic states. *Kidney Int* 56: 452–460.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lucas F, Ackroff K, Scalfani A (1989) Dietary fat-induced hyperphagia in rats as a function of fat type and physical form. *Physiol Behav* 45: 937–946.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, et al. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294: 2166–2170.
- Despres JP, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881–887.
- Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A (2011) Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 83: 124–133.
- Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, et al. (2009) Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15430–15435.
- Blake WL, Clarke SD (1990) Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J Nutr* 120: 1727–1729.
- Jump DB, Clarke SD (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 19: 63–90.
- Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L, Hanson RW (2005) Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 129–154.
- Yabaluri N, Bashyam MD (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* 35: 473–484.
- McEwen BS (2002) Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* 23: 921–939.
- Lee MJ, Yang RZ, Gong DW, Fried SK (2007) Feeding and insulin increase leptin translation. Importance of the leptin mRNA untranslated regions. *J Biol Chem* 282: 72–80.
- Bradley RL, Cheatham B (1999) Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* 48: 272–278.
- Yoo SB, Ryu V, Park EY, Kim BT, Kang DW, et al. (2011) The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 45: 343–349.
- Wang Q, Bing C, Al-Barazani K, Mossakowska DE, Wang XM, et al. (1997) Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* 46: 335–341.
- Marques A y C, Hautrive TP, Moura GB de, Callegaro M da GK, Hecktheuer LHR (2011) Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes formas de preparo na resposta biológica em ratos. *Rev. Nutr. [online]* 24: 131–141.
- Malaisse WJ, Buhar N, Zhang Y, Hacquebard M, Portois L, et al. (2009) The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. I. Liver data. *Int J Mol Med* 24: 111–123.
- Sener A, Zhang Y, Buhar N, Louchami K, Malaisse WJ, et al. (2009) The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. II. Body weight, adipose tissue mass and glycemic homeostasis. *Int J Mol Med* 24: 125–129.
- Cancelas J, Prieto PG, Villanueva-Penacarrillo ML, Zhang Y, Portois L, et al. (2007) Glucose intolerance associated to insulin resistance and increased insulin secretion in rats depleted in long-chain omega3 fatty acids. *Horm Metab Res* 39: 823–825.
- Lovejoy JC, Champagne CM, Smith SR, DeLany JP, Bray GA, et al. (2001) Relationship of dietary fat and serum cholesterol ester and phospholipid fatty acids to markers of insulin resistance in men and women with a range of glucose tolerance. *Metabolism* 50: 86–92.
- Vessby B, Tengblad S, Lithell H (1994) Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men. *Diabetologia* 37: 1044–1050.

57. Kotronen A, Velagapudi VR, Yetukuri L, Westerbacka J, Bergholm R, et al. (2009) Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia* 52: 684–690.
58. Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH (2003) Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 78: 91–98.
59. Kurotani K, Sato M, Ejima Y, Nanri A, Yi S, et al. (2012) High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo-gamma-linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. *Nutr Res* 32:669–675 e663.
60. Dias JP, Couture R (2012) Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 14: 244–253.
61. Kim OY, Lim HH, Lee MJ, Kim JY, Lee JH (2013) Association of fatty acid composition in serum phospholipids with metabolic syndrome and arterial stiffness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23: 366–74.
62. Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, et al. (2010) Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am J Clin Nutr* 92: 1350–1358.
63. Patel PS, Sharp SJ, Jansen E, Luben RN, Khaw KT, et al. (2010) Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: a pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort. *Am J Clin Nutr* 92: 1214–1222.
64. Hodge AM, English DR, O'Dea K, Sinclair AJ, Makrides M, et al. (2007) Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 86: 189–197.
65. Warensjo E, Riserus U, Vessby B (2005) Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia* 48: 1999–2005.
66. Tanaka S, Yagi Y, Yamazaki T, Mitsumoto A, Kobayashi D, et al. (2012) Characterization of fatty acid profile in the liver of SHR/NDmcr-cp (cp/cp) rats, a model of the metabolic syndrome. *Biol Pharm Bull* 35: 184–191.
67. Djousse L, Weir NL, Hanson NQ, Tsai MY, Gaziano JM (2012) Plasma phospholipid concentration of cis-palmitoleic Acid and risk of heart failure. *Circ Heart Fail* 5: 703–709.
68. Djousse L, Matthan NR, Lichtenstein AH, Gaziano JM (2012) Red blood cell membrane concentration of cis-palmitoleic and cis-vaccenic acids and risk of coronary heart disease. *Am J Cardiol* 110: 539–544.
69. Paillard F, Catheline D, Duff FL, Bourriel M, Deugnier Y, et al. (2008) Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 436–440.
70. Guo X, Li H, Xu H, Halim V, Zhang W, et al. (2012) Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS One* 7: e39286.
71. Kim HW, Rao JS, Rapoport SI, Igarashi M (2011) Regulation of rat brain polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism during graded dietary n-3 PUFA deprivation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85: 361–368.
72. von Schacky C, Fischer S, Weber PC (1985) Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Invest* 76: 1626–1631.
73. Anderson GJ, Connor WE (1994) Accretion of n-3 fatty acids in the brain and retina of chicks fed a low-linolenic acid diet supplemented with docosahexaenoic acid. *Am J Clin Nutr* 59: 1338–1346.
74. Lemaitre-Delaunay D, Pachiaudi C, Laille M, Pousin J, Armstrong M, et al. (1999) Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine. *J Lipid Res* 40: 1867–1874.
75. Tu WC, Mühlhäusler BS, Yelland LN, Gibson RA (2013) Correlations between blood and tissue omega-3 LCPUFA status following dietary ALA intervention in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88: 53–60.
76. Simopoulos AP (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* (Maywood) 233: 674–688.
77. Seppala J, Vanhala M, Kautiainen H, Eriksson J, Kampman O, et al. (2012) Prevalence of metabolic syndrome in subjects with melancholic and non-melancholic depressive symptoms. A Finnish population-based study. *J Affect Disord* 136: 543–549.
78. Kahl KG, Greggersen W, Schweiger U, Cordes J, Balijepalli C, et al. (2012) Prevalence of the metabolic syndrome in unipolar major depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 262: 313–320.
79. Pan A, Keum N, Okereke OI, Sun Q, Kivimaki M, et al. (2012) Bidirectional association between depression and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Diabetes Care* 35: 1171–1180.
80. Ryan JP, Sheu LK, Critchley HD, Gianaros PJ (2012) A neural circuitry linking insulin resistance to depressed mood. *Psychosom Med* 74: 476–482.
81. Ross BM, Seguin J, Sieswerda LE (2007) Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids Health Dis* 6: 21.
82. Lin PY, Su KP (2007) A meta-analytic review of double-blind, placebo-controlled trials of antidepressant efficacy of omega-3 fatty acids. *J Clin Psychiatry* 68: 1056–1061.
83. Martins JG (2009) EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Nutr* 28: 525–542.
84. Kozyrskiy AL, Zeng Y, Colman I, HayGlass KT, Sellers EAC, et al. (2011) Maternal distress in early life predicts the waist-to-hip ratio in schoolchildren. *J DOHAD* 2: 72–80.

10.3 ANEXO III - ARTIGO PUBLICADO

Artigo de Revisão

Artigo enviado a revista: The Scientific World Journal.

Enviado: 08 de agosto de 2012.

Publicado: 19 de setembro de 2012.

Título: Fetal and neonatal levels of Omega-3 - Effects on neurodevelopment, nutrition and growth

Autores: Juliana Rombaldi Bernardi¹; Renata de Souza Escobar¹; Charles Francisco Ferreira¹, and Patrícia Pelufo Silveira¹

¹ Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 - Porto Alegre, RS - Brazil.

E-mail: juliana.bernardi@yahoo.com.br; re_escobar@hotmail.com;
neurocientista@hotmail.com; 00032386@ufrgs.br

Review Article

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

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

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

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

Received 8 August 2012; Accepted 19 September 2012

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

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

n-3 LCPUFAs than most adults are able to consume in their diets [13]. In a recent review of studies in 13 countries within the lower and middle worldwide brackets of gross domestic product (GDP), there was a strong positive association between the economic status of the country (GDP) and the supply of total fat and n-3 LCPUFAs. In families living on a primarily plant-based diet, most of the fat and PUFAs intake come from vegetable oils and cereals [10].

It is evident that several worldwide health agencies recognize the importance of increasing dietary intake of n-3 LCPUFAs. The daily DHA recommendation during pregnancy from the Expert Committee ranges from 200–300 mg/daily (modified from [14]). For the first 6 months of life of preterm and term infants, dietary intakes of n-3 LCPUFAs should correspond to 0.45–1.5 energy% of total of fatty acids, and with an n-6 LCPUFAs to n-3 LCPUFAs ratio of 4–10 (modified from [15]). The Institute of Medicine (IOM) recommends a range of 0.6–1.2 energy% in n-3 LCPUFAs and a range of 5–10 energy% in n-6 PUFAs in children and adults [16].

In the present paper, we review the scientific evidence that relates n-3 LCPUFAs levels during these critical periods to children's neurodevelopment, nutrition, and growth. PubMed database was used to identify relevant studies, and reference lists from retrieved studies were reviewed. Study selections were limited to English and Portuguese studies involving humans and experimental studies, from 1980 to 2012.

2. Dietary Intake and Total Fat Status

In Iran, authors found a significant difference in the total n-3 LCPUFAs and DHA in breast milk in women in coastal cities compared with those in inland cities. Coastal mothers showed a significantly higher intake of fish or seafood compared with inland mothers ($P < 0.001$). The dietary intake of fish and seafood was assessed using a structured interview, called food frequency questionnaire (FFQ). Breast milk was collected from the mother's breasts by hand, pumping eight to 72 h after delivery. The study showed that dietary fish and seafood intake by the mother influenced the DHA content of breast milk.

A randomized controlled trial investigated direct supplementation of high dose fish oil to term infants in the early postnatal period (with regard to feeding practices). Infants were supplemented daily, from birth to six months, with fish oil supplement or placebo. The results indicate that direct fish oil supplementation can significantly elevate DHA levels in infancy. The study showed a successful strategy for raising infant DHA status [18]. In breastfed infants, DHA levels in breast milk were determinant for their DHA status [18].

3. Impact of Fatty Acids Status on Neurobehavioral Development

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) play an important role in the central nervous system (CNS) and are essential for early brain development. LCPUFAs comprise

approximately 15 to 30% of the brain's dry weight [19]. LCPUFAs are involved in the functioning and architecture of the central nervous system; the function of LCPUFA is demonstrated, in part, through the dependence on LCPUFA through different stages in life. The brain's structure is lipid and consists mainly of phosphoglycerides and cholesterol rich in AA and DHA [20]. Studies show that DHA affects blood-brain barrier functions and neuronal membrane fluidity; it also regulates neurotransmission systems such as serotonergic, dopaminergic, norepinephrergic, and acetylcholinergic systems [21, 22]. DHA has a significant effect on neuronal membrane dynamics and therefore on transporter, receptor, and neurotransmitter functions [19].

The fastest stage of neural development is during fetal growth. However, there is also significant development during the first five years of postnatal life. At this time, environmental factors, including nutrient intake, play a critical role in the development of the brain's cytoarchitecture [23]. n-3 and n-6 LCPUFA are required for proper brain function and for the development of a mature brain. n-3 and n-6 LCPUFA are important due to their effects on electrophysiology and cell membrane structures [24]. Human milk fatty acid composition depends on short-term and long-term maternal diet [25]. The early diet can provide the proper amount of DHA and n-6 LCPUFA to the infant's brain [26]. The psychophysiology of n-3 LCPUFAs indicates the potential effects of n-3 LCPUFAs in relation to direct changes in the brain; the potential effects include changes in cognitive measures [27].

During the third trimester of pregnancy, fetuses require approximately 40 to 60 mg of n-3 LCPUFAs per kilogram of body weight per day [28]. During the last gestational trimester and first postnatal months, there is significant growth of the human brain and a large increase in cerebral volume of DHA and AA [29]. During prenatal and perinatal growth, significant amounts of AA and DHA accumulate in the brain and hence the physiological demand for these nutrients [28].

Studies have shown evidence for the neurodevelopmental benefits of dietary PUFA during pregnancy and infancy [27, 29, 30]. In addition to the neural tissue, the retinal tissue also accumulates LCPUFA DHA during gestation. In retina rod cells, DHA accounts for 50 to 60% of the fatty acids used in the polar phosphoglycerides of the plates [20, 22]. Preterm infants are denied the full intrauterine supply of DHA available to term infants [31]; therefore, preterm infants depend on a diet that supplies all the DHA needed for growth and development.

Several studies have shown the cognitive benefits of high levels of consumption of n-3 LCPUFA in elderly populations [32–34]. There is a link between EPA and the central nervous system, which has been shown in studies that indicate that n-3 LCPUFA levels are associated with protection against certain diseases including Alzheimer's and multiple sclerosis. In animal study, author showed that EPA stimulates the expression of myelin-related proteins in rat brains. Better myelination may be associated with improved segregation of electrochemical signals transmitted to the axons; this may lead to faster speed of information processing and improved

cognition among people with high levels of n-3 LCPUFAs consumption [36].

3.1. Dietary Consumption: n-3 LCPUFAs. Reference [37] showed a positive association between DHA concentrations in breast milk and infant scores on the NBAS (Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale) Range of State cluster score. The results suggest that DHA is related to infant's superior ability to maintain optimal arousal.

Maternal intake of n-3 LCPUFA and breastfeeding predicted oppositional defiant and conduct disorder and comorbid externalizing disorder, before adjustment for confounding factors. However, there was no association between intake of n-3 LCPUFA by the mother or child with any type of externalizing disorder once sociodemographic factors were taken into account [38]. Studies show inconsistent results about the effects of n-3 LCPUFA on externalizing disorders: some studies report positive effects of n-3 LCPUFA [39, 40], but others have shown less conclusive results [41].

Confounding factors associated with inherited factors such as maternal IQ [42] and maternal nutrition present serious challenges in these studies. Prenatal exposure may persist into the postnatal environment; therefore, the identification of the precise timing of factors poses a scientific challenge. Nutrition, of course, has an essential role in mental development during different life stages. Reference [43] showed that breastfeeding is associated with positive effects on cognitive development. However, the evidence about the parallel effects of breastfeeding on emotional development is inconsistent [38, 44, 45]. There are also nonnutritional reasons why breastfeeding may influence mental health, including closeness and reciprocity [46].

Reference [47], in a double-blind randomized controlled trial, investigated the effects of raising intakes of EPA and DHA on depressed mood in mild to moderately depressed individuals who were not receiving conventional treatments for depression. The results did not show a significant effect of n-3 LCPUFA supplementation on depressed moods. Participants in the intervention group received three daily doses of 630 mg EPA, 850 mg DHA, 870 mg olive oil, 7.5 mg mixed tocopherols, and 12 mg orange oil (which was included to improve palatability and blinding) for 12 weeks. The measures of depressed mood for the experimental group were not better than those for the placebo group.

A review of studies that investigated the effects of n-3 LCPUFAs and mental illness found consistent evidence about the beneficial effects of n-3 LCPUFAs in relation to mood disorders. The results of studies that investigated an association between n-3 LCPUFAs and schizophrenia, borderline personality, attention deficit hyperactivity, and symptoms of anxiety are inconclusive. The results do not support indication of monotherapy or adjunctive treatment for mental illnesses [48].

However, there is evidence of n-3 LCPUFAs deficiency identified in women who develop postpartum depression. Postpartum depression is a serious mood disorder with the same symptoms as major depressive disorders (depressed mood, loss of interest in pleasurable activities, changes in

sleep patterns and weight, and reduced cognitive abilities and concentration) [49, 50].

Observational studies show that prevalence of postpartum depression may be associated with n-3 LCPUFAs (FAs) intake and status. However, there are few controlled trials that have evaluated the effects of increasing the intakes of FAs on depression symptoms in postpartum women. Most interventions studies investigated a reduced number of patients and typically provided fish oil-based supplements that contained high doses of EPA and DHA [51]. Prenatal fish consumption was not predictive of postnatal depression (PND); also, postnatal n-3 status was not associated with postnatal depression. However, prenatal fish consumption predicted n-3 status in mothers after birth. Based on these findings, it is difficult to assess the efficacy of n-3 LCPUFAs for the treatment of PND [52].

3.2. Supplementation: n-3 LCPUFAs. A recent review showed unclear effects of maternal prenatal and postnatal LC-PUFAs supplementation on global neurobehavioral outcomes for children born to term. However, n-3 LCPUFAs supplementation for breastfeeding women of preterm infants improved performance on tests of global neurodevelopment [53].

Fish oil supplementation (4 g of fish oil with 1.1 g EPA and 2.2 DHA/daily) starting at 20 weeks of pregnancy until birth significantly increased the fatty acid composition of maternal and neonatal erythrocytes in comparison with olive oil supplementation. The effects were partially sustained until at least 6 weeks postpartum. Similarly, administration of n-6 polyunsaturated fatty acids AA was associated with significantly lower erythrocytes in neonates in the fish oil group in comparison with controls [54].

A DOMInO (DHA to Optimize Mother Infant Outcome) study with 2,399 women investigated whether DHA supplementation during the second half of gestation reduced the risk for depressed maternal mood (Edinburgh Postnatal Depression Scale) during the postpartum period. Women in the DHA group consumed 3 daily capsules of fish oil that contained a total of 800 mg DHA and 100 mg EPA (eicosapentaenoic acid); women in the control group consumed similar supplement levels of vegetable oil. The group given DHA did not show significant reduction in the rates of PND [55].

In the same study, researchers investigated early cognitive development in the offspring at 18 months of age. The results did not show an overall effect of DHA on development (assessed using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development including cognitive scores and language scores [55]). With the objective of determining whether DHA deficiency occurs in pregnant women and contributes to poor infant development, 200 mg/g of DHA was administered to women from 16 weeks of gestation until delivery. The results showed a visual acuity below average among infants in the placebo than in the DHA intervention group [56].

Daily maternal supplementation with 1.6 g EPA or 1.1 g DHA from the 25th gestational week to an average 3-4 months in early breastfeeding decreased the risk for food allergies and IgE-associated eczema during the first year of

life. The effects were shown in infants with a family history of allergic disease compared with a placebo group [57].

Supplementation with a relatively high dose of fish oil (1.1 g EPA and 2.2 g DHA/daily) during the last 20 weeks of pregnancy is not only safe but also has potential beneficial effects, but the effects need to be further investigated. At age 2.5 years, children in the fish oil-supplemented group showed a significantly higher score for hand-eye coordination than children in the placebo group. There was a correlation between hand-eye coordination scores with n-3 LCPUFAs levels in cord blood erythrocytes, and a negative correlation with n-6 PUFA [58].

Reference [29] found that giving pregnant and lactating women n-3 very long-chain PUFAs supplementation was associated with higher IQ scores at 4 years of age in comparison with maternal supplementation with n-6 long-chain PUFAs. There were no significant differences on the Kaufman Assessment Battery for Children test at 7 years of age between children whose mothers had taken cod liver oil (n-3 LCPUFAs rich) or corn oil (n-6 PUFA rich) [59].

A multicenter, randomized controlled trial from DINO (Docosahexaenoic Acid for the Improvement of Neurodevelopmental Outcome in Preterm Infants) with 657 lactating administered six 500 mg DHA-rich tuna oil capsules per day (for breast milk DHA concentration). The study showed that a DHA dose of approximately 1% total fatty acids in early life did not increase Bayley Mental Developmental (MDI) scores of preterm infants with less than 33 weeks of gestation. However, the dosage improved the MDI scores of girls [60].

In another study, breast-feeding women received identical capsules containing either DHA algal oil (200 mg/d of DHA) or a vegetable oil (no DHA) from delivery until 4 months postpartum. The results showed that at 5 years, there were no differences in visual function (Bailey-Lovie acuity chart), transient visual evoked potential, or sweep visual evoked potential testing between children whose mothers received DHA versus placebo. However, children whose mothers received DHA versus placebo performed significantly better on the Sustained Attention Subscale of the Leiter International Performance Scale. There were no statistically significant differences between groups on other neuropsychological domains [61].

Yet another study was carried out with the objective of determining the effect of DHA supplementation on neurodevelopment status and visual function. Breastfeeding mothers were administered capsules containing either high-DHA concentration algal oil (200 mg DHA/day) or a vegetable oil (no DHA) to breastfeeding women for 4 months after delivery. The intervention group showed 50% greater content of maternal plasma phospholipids DHA, 75% greater content of DHA in milk lipids, and 35% greater content of DHA in infant plasma phospholipids. However, higher infant plasma phospholipids DHA content did not show effects on visual acuity at either 4 or 8 months of age [62].

The DINO Trial DHA found that supplementation for infants <33 weeks gestation with tuna oil capsules reduced the incidence of bronchopulmonary dysplasia in boys and in all infants with a birth weight <1250 g; it also reduced the

incidence of reported hay fever in boys at either 12 or 18 months [63].

Reference [64] compared the content of DHA in breast milk in three groups: mothers with habitual high fish intake, with fish oil supplementation and with olive oil supplementation. The authors described a small effect of DHA levels in breast milk on early language development (word production) of breast-fed infants. No beneficial effect was reported for problem solving, though the data suggest there may be an effect in girls.

Reference [65], in a follow-up study, evaluated IQ, receptive and expressive vocabulary, visual-motor function, and visual acuity in formula-fed and breast-fed infants. Healthy term infants ($n = 197$) less than a week old were randomized to be fed formulas for one year, one containing DHA or another containing both AA and DHA; there was also a group of infants who were exclusively breastfed for at least 3 months. At 39 months, IQ, receptive and expressive language, visual-motor function, and visual acuity were not different between the randomized formula groups or between the breastfed and formula groups. Growth achievement, red blood cell fatty acid levels, and morbidity did not differ between the groups [66].

3.3. Use of Food Supplements with n-3 LCPUFAs. In an observational study of subjects born in 1936 whose mental ability was tested in 1947 and who were followed up in 2000-2001, the childhood IQ did not differ significantly by category of food supplement use. However, at the age of 64 years, cognitive function was higher in food supplement users than in nonusers, before adjustment for childhood IQ [67]. In a nested case-control study, erythrocyte membrane n-3 content was higher in fish oil supplement users than in nonusers, but cognitive function did not differ significantly between the groups [67].

4. Impact of Fatty Acids Status on Nutrition and Growth

A recent review limited to human studies published in English from 2000 until 2010 on n-3 and growth suggests that n-3 (DHA in particular) during pregnancy, lactation and early life may be associated with significant benefits for infant growth and development in developing countries. Studies in developing countries show that a higher n-3 intake or supplementation during pregnancy may result in improvements in birth weight, length, and gestational age. Limited data from developing countries suggest that ALA or DHA supplementation during lactation and in infants may be beneficial for growth and development of young children; these benefits are more pronounced in undernourished children. However, there is no evidence of improvements in growth following n-3 supplementation in children >2 years of age [68].

4.1. Dietary Consumption of n-3 Fatty Acid. Reference [69] compared the levels of the main long-chain PUFA between birth and the first year of age. The results showed a significant

decrease with age in the proportion of these fatty acids in the plasma of children. At one year of age, the percentage of DHA in the extended breastfeeding group (more than 6 months) differed significantly from the other groups, that is, medium term breastfeeding (more than 3 and less than 5 months) and exclusive formula feeding.

An interventional study carried out in Brazil showed that postnatal sardine consumption (100 g of sardines two or three times a week) contributed to an increase omega-3 series fatty acids (DHA and DPA) on the composition of breast milk of mothers at 15 and 30 days into the study [70].

In a prospective, observational cohort study with 2109 subjects who were enrolled in the Project Viva, in the USA, the authors investigated if maternal marine n-3 LCPUFAs and seafood intake were associated with birth weight, birthweight for gestational-age z value (fetal growth), length of gestation, low birth weight, preterm delivery, and babies small for gestational age. The study showed that increased consumption of the n-3 LCPUFAs DHA and EPA was associated with a modest decrease in fetal growth. The study did not show any association between higher seafood or n-3 LCPUFAs intake and length of gestation [71].

A prospective study with 62099 women in Norway (Norwegian Mother and Child Cohort Study-MoBa) investigated the influence of maternal intakes of seafood and supplementary n-3 LCPUFAs in infant birth weight, length, and head circumference. The researchers found that maternal seafood consumption was positively associated with birth size, driven by lean fish intake, while supplementary n-3 intake was negatively associated with infant head circumference [72].

4.2. Supplementation with n-3 LCPUFAs

4.2.1. Experimental Studies. A study was conducted with 22 Lister Hooded rats that are divided into two groups: the control group (CG) which received a casein-based diet, and the flaxseed group (FG) which received 25% flaxseed diet supplement, and 14% casein showed that, during gestation and lactation, the FG was similar to the CG group in relation to food intake and litter size. The same result was observed for milk fat content and total energy value. At weaning, the FG group was similar to the CG group in both in offspring body weight and in weight gain of pups during lactation [73]. However, a study using only female Wistar rats ($n = 16$) and the same group division (FG and CG) showed that mothers on the flaxseed diet gained less weight during lactation and their offspring had lower body weight only after weaning. At 170 days, lower hemoglobin levels were observed in the FG group, but there was no statistically significant difference in visceral fat mass between groups [74].

A study with female Wistar rats ($n = 18$) administered three types of diet: control group (CG) with 7% soy oil; flaxseed group (FG) with 10% flaxseed diet (25 g), both fed ad libitum diets and a modified control group (MCG) with 10% soy oil, pair-fed with the FG. The diets were given to dams during preconception, pregnancy, and lactation and to their pups after weaning. The offspring of FG dams showed lower body mass than those of CG dams. The content of

DHA in the hippocampus was higher in the FG, followed by the MCG compared with the CG. Hippocampal DHA content correlated with better spatial memory performance in the FG, whereas AA content correlated with longer time in solving tasks [75].

4.2.2. Clinical Studies. A recent review shows that LC-PUFAs supplementation during pregnancy is associated with modest increases in birth size in both low-income and high-income populations. However, postnatal supplementation with LC-PUFAs did not influence infant growth [53].

Babies born of primiparous Mexican women who received 400 mg/d of algal DHA during the second half of the pregnancy term were heavier and had larger head circumferences at birth than children whose mothers received placebo (olive oil). However, no effect was observed in multiparous mothers. Children of primiparous women who were given DHA were taller at 18 months than those of primiparous women given placebo. The authors suggest that since primiparous women were, on average, younger than the multiparous women, their own body stores of DHA are not well established and available to the fetus and infant [76].

Reference [62] found that there were no statistically significant differences in weight, length, or head circumference between the 2 groups of infants at any time (high-DHA algal oil or a vegetable oil without DHA for 4 months after delivery). At all ages, these measures were within the normal range for age in both groups.

Supplementation with fish oil (1.1 g EPA and 2.2 DHA/daily) or olive oil starting at 18–20 weeks of pregnancy and continued until delivery showed similar growth measurements in the two groups at age 2^{1/2} years [58].

A randomized, double-blind trial gave lactating mothers fish oil or olive oil supplements for 4 months; the study followed infant development for 2.5 years and showed that children from the fish oil group had larger head circumference and higher BMI than those in the olive oil group after adjustment for relevant confounds. Both body composition and head circumference at 2.5 years of age positively correlated with the DHA content of maternal red blood cells at the end of the intervention [77].

5. Conclusions

Experimental, biochemical, and epidemiological evidence support the hypothesis that low n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFA) levels are associated with dysfunctional brain development and impaired growth; the evidence also shows that n-3 supplementation is useful for improvement of specific parameters, especially those related to memory and cognition. However, the precise definition of the method of use and dosages is still unclear. Large-scale, well-controlled trials should be carried out to confirm the efficacy of the acids and establish the minimum dose and length of supplementation to significantly improve clinical outcomes. It is also important to determine the use of the acids on different stages of development. n-3 LCPUFAs represent an attractive supplementary alternative, because they are perceived as

a natural substance rather than an artificial supplement. In sum, the dietary consumption and supplementation of n-3 LCPUFAs could provide physical and mental health benefits for development.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the contribution of Carla Dalmaz (Biochemistry Department, UFRGS, Brazil) in the discussion and preparation of the early draft of this paper. There is no conflict of interests, either financial or of any other nature in relation to the present work. Financial support was received from ARD/FAPERGS 2010 (Silveira PP. 10/0474-2); Universal National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq)—Brazil 2010 (Silveira PP. 478820/2010-0); FIPE/HCPA (GPPG 09-410); Foundation for the Coordination of Higher Education and Graduate Training (CAPES); INCT Translational Medicine (CNPq) 573671/2008-7.

References

- [1] M. T. Clandinin, J. E. Chappell, and S. Leong, "Extrauterine fatty acid accretion in infant brain: implications for fatty acid requirements," *Early Human Development*, vol. 4, no. 2, pp. 131–138, 1980.
- [2] M. T. Clandinin, J. E. Chappell, and S. Leong, "Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements," *Early Human Development*, vol. 4, no. 2, pp. 121–129, 1980.
- [3] M. Martinez, "Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development," *Journal of Pediatrics*, vol. 120, no. 4, part 2, pp. 129–138, 1992.
- [4] F. M. Campbell, A. M. Clohessy, M. J. Gordon, K. R. Page, and A. K. Dutta-Roy, "Uptake of long chain fatty acids by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells: role of plasma membrane fatty acid-binding protein," *Journal of Lipid Research*, vol. 38, no. 12, pp. 2558–2568, 1997.
- [5] A. K. Dutta-Roy, "Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 71, no. 1, supplement, pp. 315S–22S, 2000.
- [6] S. L. Prescott and J. A. Dunstan, "Prenatal fatty acid status and immune development: the pathways and the evidence," *Lipids*, vol. 42, no. 9, pp. 801–810, 2007.
- [7] C. Agostoni, "Docosahexaenoic acid (DHA): from the maternal-foetal dyad to the complementary feeding period," *Early Human Development*, vol. 86, supplement 1, pp. 3–6, 2010.
- [8] W. S. Harris, W. E. Connor, and S. Lindsey, "Will dietary ω -3 fatty acids change the composition of human milk?" *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 40, no. 4, pp. 780–785, 1984.
- [9] I. B. Helland, K. Saarem, O. D. Saugstad, and C. A. Drevon, "Fatty acid composition in maternal milk and plasma during supplementation with cod liver oil," *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 52, no. 11, pp. 839–845, 1998.
- [10] K. F. Michaelsen, K. G. Dewey, A. B. Perez-Exposito, M. Nurhasan, L. Lauritzen, and N. Roos, "Food sources and intake of n-6 and n-3 fatty acids in low-income countries with emphasis on infants, young children (6–24 months), and pregnant and lactating women," *Maternal and Child Nutrition*, vol. 7, no. 2, pp. 124–140, 2011.
- [11] J. P. Schuchardt, M. Huss, M. Stauss-Grabo, and A. Hahn, "Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children," *European Journal of Pediatrics*, vol. 169, no. 2, pp. 149–164, 2010.
- [12] M. Gil-Campos and J. Dalmau Serra, "Importance of docosahexaenoic acid (DHA): functions and recommendations for its ingestion in infants," *Anales de Pediatría*, vol. 73, no. 3, pp. 142.e1–148.e1, 2010.
- [13] E. Oken and M. B. Belfort, "Fish, fish oil, and pregnancy," *Journal of the American Medical Association*, vol. 304, no. 15, pp. 1717–1718, 2010.
- [14] R. G. Jordan, "Prenatal omega-3 fatty acids: review and recommendations," *Journal of Midwifery and Women's Health*, vol. 55, no. 6, pp. 520–528, 2010.
- [15] P. Guesnet and J. M. Alessandri, "Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS)—implications for dietary recommendations," *Biochimie*, vol. 93, no. 1, pp. 7–12, 2011.
- [16] P. Trumbo, S. Schlicker, A. A. Yates, and M. Poos, "Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids," *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 102, no. 11, pp. 1621–1630, 2002.
- [17] B. Olang, M. Hajifaraji, M. A. Ali et al., "Docosahexaenoic acid in breast milk reflects maternal fish intake in Iranian mothers," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 3, pp. 441–446, 2012.
- [18] S. J. Meldrum, N. D'Va, Y. Casadio et al., "Determinants of DHA levels in early infancy: differential effects of breast milk and direct fish oil supplementation," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 86, no. 6, pp. 233–239, 2012.
- [19] B. Hallahan and M. R. Garland, "Essential fatty acids and mental health," *British Journal of Psychiatry*, vol. 186, pp. 275–277, 2005.
- [20] M. A. Crawford, "The role of dietary fatty acids in biology: their place in the evolution of the human brain," *Nutrition Reviews*, vol. 50, no. 4, part 2, pp. 3–11, 1992.
- [21] G. Fontani, F. Corradeschi, A. Felici, E. Alfatti, S. Migliorini, and L. Lodi, "Cognitive and physiological effects of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 35, no. 11, pp. 691–699, 2005.
- [22] P. M. Kidd, "Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids," *Alternative Medicine Review*, vol. 12, no. 3, pp. 207–227, 2007.
- [23] P. Levitt, "Structural and functional maturation of the developing primate brain," *Journal of Pediatrics*, vol. 143, no. 4, supplement, pp. S35–S45, 2003.
- [24] K. Kitajka, A. J. Sinclair, R. S. Weisinger et al., "Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 30, pp. 10931–10936, 2004.
- [25] M. H. Jørgensen, O. Hernell, E. L. Hughes, and K. F. Michaelsen, "Is there a relation between Docosahexaenoic acid concentration in mothers' milk and visual development in term infants?" *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 32, no. 3, pp. 293–296, 2001.
- [26] E. M. Novak, R. A. Dyer, and S. M. Innis, "High dietary ω -6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth," *Brain Research*, vol. 1237, pp. 136–145, 2008.

- [27] J. L. Daniels, M. P. Longnecker, A. S. Rowland, and J. Golding. "Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring." *Epidemiology*, vol. 15, no. 4, pp. 394–402, 2004.
- [28] M. T. Clandinin, J. E. Chappell, and J. E. E. Van Aerde. "Requirements of newborn infants for long chain polyunsaturated fatty acids." *Acta Paediatrica Scandinavica, Supplement*, vol. 78, no. 351, pp. 63–71, 1989.
- [29] I. B. Helland, L. Smith, K. Saarem, O. D. Saugstad, and C. A. Drevon. "Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age." *Pediatrics*, vol. 111, no. 1, pp. e39–e44, 2003.
- [30] E. Larque, H. Demmelmair, and B. Koletzko. "Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system." *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 967, pp. 299–310, 2002.
- [31] M. T. Clandinin, J. E. Chappell, and T. Heim. "Fatty acid utilization in perinatal de novo synthesis of tissues." *Early Human Development*, vol. 5, no. 4, pp. 355–366, 1981.
- [32] M. C. Morris, D. A. Evans, J. L. Bienias et al., "Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease." *Archives of Neurology*, vol. 60, no. 7, pp. 940–946, 2003.
- [33] M. H. Eskelinen, T. Ngandu, E. L. Helkala et al., "Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study." *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 23, no. 7, pp. 741–747, 2008.
- [34] V. Solfrizzi, A. M. Colacicco, A. D'Introno et al., "Dietary fatty acids intakes and rate of mild cognitive impairment. The Italian Longitudinal Study on Aging." *Experimental Gerontology*, vol. 41, no. 6, pp. 619–627, 2006.
- [35] S. Salvati, F. Natali, L. Attorri et al., "Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain." *Journal of Neuroscience Research*, vol. 86, no. 4, pp. 776–784, 2008.
- [36] M. K. Georgieff. "Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement." *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 85, no. 2, pp. 614S–620S, 2007.
- [37] S. L. Hart, L. M. Boylan, S. R. Carroll et al., "Brief report: newborn behavior differs with docosahexaenoic acid levels in breast milk." *Journal of Pediatric Psychology*, vol. 31, no. 2, pp. 221–226, 2006.
- [38] A. Waylen, T. Ford, R. Goodman, M. Samara, and D. Wolke. "Can early intake of dietary omega-3 predict childhood externalizing behaviour?" *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, vol. 98, no. 11, pp. 1805–1808, 2009.
- [39] N. Sinn and J. Bryan. "Effect of supplementation with polyunsaturated fatty acids and micronutrients on learning and behavior problems associated with child ADHD." *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, vol. 28, no. 2, pp. 82–91, 2007.
- [40] A. J. Richardson and P. Montgomery. "The Oxford-Durham study: a randomized, controlled trial of dietary supplementation with fatty acids in children with developmental coordination disorder." *Pediatrics*, vol. 115, no. 5, pp. 1360–1366, 2005.
- [41] W. C. Heird and A. Lapillonne. "The role of essential fatty acids in development." *Annual Review of Nutrition*, vol. 25, pp. 549–571, 2005.
- [42] A. Thapar and M. Rutter. "Do prenatal risk factors cause psychiatric disorder? Be wary of causal claims." *British Journal of Psychiatry*, vol. 195, no. 2, pp. 100–101, 2009.
- [43] J. W. Anderson, B. M. Johnstone, and D. T. Remley. "Breastfeeding and cognitive development: a meta-analysis." *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 70, no. 4, pp. 525–535, 1999.
- [44] N. B. Allen, P. M. Lewinsohn, and J. R. Seeley. "Prenatal and perinatal influences on risk for psychopathology in childhood and adolescence." *Development and Psychopathology*, vol. 10, no. 3, pp. 513–529, 1998.
- [45] M. Robinson, W. H. Oddy, J. Li et al., "Pre- and postnatal influences on preschool mental health: a large-scale cohort study." *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, vol. 49, no. 10, pp. 1118–1128, 2008.
- [46] D. M. Dignam. "Understanding intimacy as experienced by breastfeeding women." *Health Care for Women International*, vol. 16, no. 5, pp. 477–485, 1995.
- [47] P. J. Rogers, K. M. Appleton, D. Kessler et al., "No effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) supplementation on depressed mood and cognitive function: a randomised controlled trial." *British Journal of Nutrition*, vol. 99, no. 2, pp. 421–431, 2008.
- [48] B. M. Ross, J. Seguin, and L. E. Sieswerda. "Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid?" *Lipids in Health and Disease*, vol. 6, article 21, 2007.
- [49] S. R. De Vriese, A. B. Christophe, and M. Maes. "Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression." *Life Sciences*, vol. 73, no. 25, pp. 3181–3187, 2003.
- [50] Y. W. Chen and S. C. Dilsaver. "Lifetime rates of suicide attempts among subjects with bipolar and unipolar disorders relative to subjects with other Axis I disorders." *Biological Psychiatry*, vol. 39, no. 10, pp. 896–899, 1996.
- [51] U. Ramakrishnan, B. Imhoff-Kunsch, and A. M. Digirolamo. "Role of docosahexaenoic acid in maternal and child mental health." *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 89, no. 3, pp. 958S–962S, 2009.
- [52] J. C. Browne, K. M. Scott, and K. M. Silvers. "Fish consumption in pregnancy and omega-3 status after birth are not associated with postnatal depression." *Journal of Affective Disorders*, vol. 90, no. 2-3, pp. 131–139, 2006.
- [53] M. Makrides, C. T. Collins, and R. A. Gibson. "Impact of fatty acid status on growth and neurobehavioural development in humans." *Maternal and Child Nutrition*, vol. 7, no. 2, pp. 80–88, 2011.
- [54] J. A. Dunstan, T. A. Mori, A. Barden et al., "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in pregnancy on maternal and fetal erythrocyte fatty composition." *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 58, no. 3, pp. 429–437, 2004.
- [55] M. Makrides, R. A. Gibson, A. J. McPhee et al., "Effect of DHA supplementation during pregnancy on maternal depression and neurodevelopment of young children: a randomized controlled trial." *Journal of the American Medical Association*, vol. 304, no. 15, pp. 1675–1683, 2010.
- [56] S. M. Innis and R. W. Friesen. "Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants." *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 87, no. 3, pp. 548–557, 2008.
- [57] C. Furuholm, K. Warstedt, J. Larsson et al., "Fish oil supplementation in pregnancy and lactation may decrease the risk of infant allergy." *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, vol. 98, no. 9, pp. 1461–1467, 2009.
- [58] J. A. Dunstan, K. Simmer, G. Dixon, and S. L. Prescott. "Cognitive assessment of children at age 2 1/2 years after

- maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomised controlled trial." *Archives of Disease in Childhood*, vol. 93, no. 1, pp. F45–F50, 2008.
- [59] I. B. Helland, L. Smith, B. Blomen, K. Saarem, O. D. Saugstad, and C. A. Drevon, "Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's iq and body mass index at 7 years of age," *Pediatrics*, vol. 122, no. 2, pp. e472–e479, 2008.
- [60] M. Makrides, R. A. Gibson, A. J. McPhee et al., "Neurodevelopmental outcomes of preterm infants fed high-dose docosahexaenoic acid: a randomized controlled trial." *Journal of the American Medical Association*, vol. 301, no. 2, pp. 175–182, 2009.
- [61] C. L. Jensen, R. G. Voigt, A. M. Llorente et al., "Effects of early maternal docosahexaenoic acid intake on neuropsychological status and visual acuity at five years of age of breast-fed term infants," *Journal of Pediatrics*, vol. 157, no. 6, pp. 900–905, 2010.
- [62] C. L. Jensen, R. G. Voigt, T. C. Prager et al., "Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 82, no. 1, pp. 125–132, 2005.
- [63] B. J. Manley, M. Makrides, C. T. Collins et al., "High-dose docosahexaenoic acid supplementation of preterm infants: respiratory and allergy outcomes," *Pediatrics*, vol. 128, no. 1, pp. e71–e77, 2011.
- [64] L. Lauritzen, M. H. Jørgensen, S. F. Olsen, E. M. Straarup, and K. F. Michaelsen, "Maternal fish oil supplementation in lactation: effect on developmental outcome in breast-fed infants," *Reproduction Nutrition Development*, vol. 45, no. 5, pp. 535–547, 2005.
- [65] N. Auestad, M. B. Montalto, R. T. Hall et al., "Visual acuity, erythrocyte fatty acid composition, and growth in term infants fed formulas with long chain polyunsaturated fatty acids for one year," *Pediatric Research*, vol. 41, no. 1, pp. 1–10, 1997.
- [66] N. Auestad, D. T. Scott, J. S. Janowsky et al., "Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age," *Pediatrics*, vol. 112, no. 3, part 1, pp. e177–e183, 2003.
- [67] L. J. Whalley, H. C. Fox, K. W. Wahle, J. M. Starr, and I. J. Deary, "Cognitive aging, childhood intelligence, and the use of food supplements: possible involvement of n-3 fatty acids," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 80, no. 6, pp. 1650–1657, 2004.
- [68] S. L. Huffman, R. K. Harika, A. Eilander, and S. J. Osendarp, "Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review," *Maternal and Child Nutrition*, vol. 7, supplement 3, pp. 44–65, 2011.
- [69] P. S. Crespo, N. T. Quirante, L. A.-E. Azuara, L. C. González, J. A. P. Perera, and F. A. Lodeiro, "Ácidos grasos n-3 y n-6 en plasma al nacer y al año de edad y relación con el tipo de alimentación," *Anales de Pediatría*, vol. 68, pp. 570–575, 2008.
- [70] R. V. Patin, M. R. Vitolo, M. A. Valverde, P. O. Carvalho, G. M. Pastore, and F. A. Lopez, "The influence of sardine consumption on the omega-3 fatty acid content of mature human milk," *Jornal de Pediatría*, vol. 82, no. 1, pp. 63–69, 2006.
- [71] E. Oken, K. P. Kleinman, S. F. Olsen, J. W. Rich-Edwards, and M. W. Gillman, "Associations of seafood and elongated n-3 fatty acid intake with fetal growth and length of gestation: results from a US pregnancy cohort," *American Journal of Epidemiology*, vol. 160, no. 8, pp. 774–783, 2004.
- [72] A. L. Brantsaeter, B. E. Birgisdottir et al., "Maternal seafood consumption and infant birth weight, length and head circumference in the Norwegian Mother and Child Cohort Study," *British Journal of Nutrition*, vol. 107, no. 3, pp. 436–444, 2012.
- [73] C. D. Leite and G. C. Vicente, "Effects of flaxseed on rat milk creatinocrit and its contribution to offspring body growth," *Journal of Pediatrics*, vol. 88, no. 1, pp. 74–78, 2012.
- [74] L. F. M. D. F. Cardozo, L. L. Soares, M. A. Chagas, and G. T. Boaventura, "Maternal consumption of flaxseed during lactation affects weight and hemoglobin level of offspring in rats," *Jornal de Pediatría*, vol. 86, no. 2, pp. 126–130, 2010.
- [75] F. S. Fernandes, A. S. de Souza, M. das Graças Tavares do Carmo, and G. T. Boaventura, "Maternal intake of flaxseed-based diet (*Linum usitatissimum*) on hippocampus fatty acid profile: implications for growth, locomotor activity and spatial memory," *Nutrition*, vol. 27, no. 10, pp. 1040–1047, 2011.
- [76] A. D. Stein, M. Wang, R. Martorell et al., "Growth to age 18 months following prenatal supplementation with docosahexaenoic acid differs by maternal gravidity in Mexico," *Journal of Nutrition*, vol. 141, no. 2, pp. 316–320, 2011.
- [77] L. Lauritzen, C. Hoppe, E. M. Straarup, and K. F. Michaelsen, "Maternal fish oil supplementation in lactation and growth during the first 2.5 years of life," *Pediatric Research*, vol. 58, no. 2, pp. 235–242, 2005.

11. APÊNDICES

11.1 APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho(a) _____ e você _____ estão sendo convidados(as) a participar da pesquisa intitulada **“Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde da Criança nos Primeiros Três Anos de Vida”** que tem com o objetivo principal compreender os efeitos de diferentes situações ocorridas durante a gestação que podem interferir sobre o crescimento, a nutrição, o comportamento, o metabolismo e o desenvolvimento infantil, assim como a possibilidade de identificar, muito cedo, os fatores que possam trazer prejuízos para a criança e para o adulto no futuro. Em específico sobre essa avaliação do projeto, pretende-se verificar se essas diferentes situações ocorridas durante a gestação podem alterar as preferências alimentares nas crianças de três e quatro anos de idade e se podem estar mediadas por genes relacionados aos sabores.

Dessa forma, os resultados da presente pesquisa trarão benefícios na compreensão do desenvolvimento de doenças, assim como sua prevenção, relacionadas com problemas de saúde ocorridos durante a gestação e no início da infância, além de acompanhar o crescimento e desenvolvimento do seu filho.

Você e sua criança estão sendo convidados para participar desta pesquisa, por terem participado do estudo anterior, assim, esta pesquisa é uma extensão do outro estudo inicial. Para alcançar os objetivos desta pesquisa, será realizada entrevista em encontro com você e seu(u) filho(a) no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) aos 36 meses de vida da criança, que pode variar de 30 a 40 minutos.

Para este projeto será realizado o teste de preferência aos sabores amargo e doce e a coleta de sangue. A avaliação da tolerância aos sabores ocorrerá com a criança, em presença da mãe ou responsável, em sala individualizada localizada no CPC do HCPA. A aceitação das crianças às diferentes soluções contendo os sabores será mensurada pela preferência obtida no próprio teste. As substâncias utilizadas nos testes (sabores amargo e doce) foram utilizadas em estudos anteriores, com crianças da mesma faixa etária, não havendo riscos à saúde.

A coleta de sangue (2 mL) será realizada nesse encontro, também no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), na parte da manhã, sendo fornecido lanche após a coleta. Serão dosados genes específicos ligados aos sabores amargo e doce. Será realizada coleta de sangue por profissional treinado com agulhas e seringas descartáveis, sem risco de contaminação. Após a análise, a amostra de sangue será inutilizada e descartada, não podendo ser utilizada para outros fins. A criança sentirá um pequeno desconforto no momento da picada, no local onde a agulha foi colocada, que logo após o término da coleta desaparecerá. A região onde foi realizada a punção poderá ficar dolorida após o procedimento, mas em poucas horas este desconforto desaparecerá. Após a coleta, poderá surgir no local onde foi coletado o sangue uma área vermelha, que desaparecerá depois de algum tempo, não ocasionando riscos à saúde da criança.

Os seus dados de identificação e do seu(u) filho(a) não serão divulgados, preservando as suas identidades. As demais informações obtidas serão utilizadas somente para essa pesquisa e serão armazenadas durante cinco anos para posterior descarte.

Se, durante algum dos encontros da pesquisa, seu filho apresentar problema de saúde agudo, de maior gravidade como febre alta, dificuldade respiratória, desidratação, por exemplo, ou mesmo se você estiver se sentindo muito cansada, triste ou chorosa, os entrevistadores realizarão uma avaliação. Caracterizada uma situação de emergência, serão encaminhados para avaliação no Serviço de Emergência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Diferentemente, situações que, não necessitem de atendimento de emergência, serão encaminhadas às Unidades Básicas de Saúde de referência, próximo da sua casa.

Caso opte por não participar de algum procedimento da pesquisa, você e seu(u) filho(a) não sofrerão prejuízo.

QUESTIONÁRIO DADOS GERAIS

QUESTIONÁRIO DADOS GERAIS	
Nome do Hospital: _____	NUHOSPITAL _____
Data da entrevista: ___ / ___ / ___	GDE ___ / ___ / ___
Entrevistador(a): _____	ENTREV _____
A1) Nome da mãe: _____ Endereço: _____ _____ () casa () apartamento Referência / Como chegar: _____ Têm planos para se mudar? Se sim, informações do novo endereço _____ Telefone fixo: () _____ Outros telefones para contato: () _____ Unidade de Saúde (Pré-natal): _____ Linha de ônibus: _____ E-mail: _____	
DADOS PARA CONHECIMENTO DOS GRUPOS DE ESTUDO:	
(1) Diabetes (2) Hipertensão (3) Tabagismo (4) RCIU idiopático (5) Controle	
DADOS GERAIS DA MÃE	
A2) Qual é sua data de nascimento? ___ / ___ / ___	PNASC ___ / ___ / ___
A3) Cor ou raça da mãe? Declarada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena Observada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena	CORMAED _____ CORMAEO _____
A4) Cor ou raça do pai? Declarada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena Observada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena (8) NSA (9) IGN	CORPAID _____ CORPAIO _____
A5) Qual é a idade do pai da criança? _____ anos completos (777) Não sabe	PIDADE _____
A6) Quantas pessoas moram na sua casa, incluindo a mãe e criança? _____	PPESS _____
A7) Dessas, quantas pessoas são adultas? _____	PPESSA _____
A8) Quantos irmãos você tem ou teve? _____	PIRMA _____
A9) Qual a sua situação conjugal atual? (1) Casada ou mora com companheiro (3) Viúva (2) Solteira, sem companheiro ou separada (4) Divorciada	PCONJU _____
A10) Qual a idade de sua menarca (primeira menstruação)? _____ anos	PMENAR _____
A11) Você já engravidou antes? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A38. (0) Não (1) Sim	PFILHOS _____
SE SIM:	
A12) Número de filhos (incluir o atual)? _____ (88) NSA	PANFIL _____
A13) Número de gestações? _____ (88) NSA	PANGES _____
A14) Número de filhos que não nasceram (abortos)? _____ (88) NSA	PAABORT _____
A15) Algum filho é doente? (0) Não (1) Sim (88) NSA	PAND _____
A16) Se a resposta anterior for positiva, qual a doença? _____ (88) NSA	PANDQ _____
DADOS DO FILHO ANTERIOR:	
A17) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino	FSEX1 _____
A18) Data de nascimento? ___ / ___ / ___ (88) NSA	FNASC1 ___ / ___ / ___
A19) Peso ao nascimento? _____ gramas (88) NSA	FAPN1 _____ g
A20) Comprimento ao nascimento? _____ cm (88) NSA	FACN1 _____ cm
A21) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? _____ (88) NSA	FAM1 _____ semanas

A22) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim	(88) NSA	FAM1 _____
A23) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses	(88) NSA	AMT1 _____
DADOS DO OUTRO FILHO:		
A24) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		FSEX2 _____
A25) Data de nascimento? ___ / ___ / ___	(88) NSA	FNASC2 ___ / ___ / ___
A26) Peso ao nascimento? _____ gramas	(88) NSA	FAPN2 _____ g
A27) Comprimento ao nascimento? _____ cm	(88) NSA	FACN2 _____ cm
A28) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? _____	(88) NSA	FAM2 _____ semanas
A29) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim	(88) NSA	FAM2 _____
A30) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses	(88) NSA	AMT2 _____
DADOS DO OUTRO FILHO:		
A31) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		FSEX3 _____
A32) Data de nascimento? ___ / ___ / ___	(88) NSA	FNASC3 ___ / ___ / ___
A33) Peso ao nascimento? _____ gramas	(88) NSA	FAPN3 _____ g
A34) Comprimento ao nascimento? _____ cm	(88) NSA	FACN3 _____ cm
A35) Com quantas semanas de gravidez a criança nasceu? _____	(88) NSA	FAM3 _____ semanas
A36) Amamentou seu filho? (0) Não (1) Sim	(88) NSA	FAM3 _____
A37) SE SIM, por quanto tempo? _____ meses	(88) NSA	AMT3 _____
A38) Você tem religião? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A40. (0) Não (1) Sim		
		RELIG _____
SE SIM:		
A39) Qual é a sua religião? _____	(88) NSA	RELIGQ _____
A40) Até que ano da escola você estudou? Série? _____ Grau? _____		
		PESCOL1 _____ PESCOL2 _____
A41) Você sabe ler e escrever? (0) Não (1) Sim		
		PLER _____
A42) Qual é a sua profissão? _____		
		PPROF _____
A43) Qual é a sua ocupação? _____		
		POCUP _____
A44) Você trabalha com carteira assinada atualmente? (0) Não (1) Sim		
		PCART _____
A45) Até que ano da escola o pai do(a) seu(sua) filho(a) estudou? Série? _____ Grau? _____ (77) Não sabe		
		PASCOL1 _____ PASCOL2 _____
A46) Qual é a profissão do pai do(a) seu(ua) filho(a)? _____ (7) Não sabe		
		PAPROF _____
A47) Qual é a ocupação do pai do(a) seu(ua) filho(a)? _____ (7) Não sabe		
		PAOCUP _____
A48) Ele trabalha com carteira assinada atualmente? (0) Não (1) Sim (2) Está afastado (7) Não sabe		
		PACART _____
A49) No mês passado, quanto ganharam as pessoas que moram na sua casa? (incluir renda de trabalho, benefícios ou aposentadoria)		
Renda: Pessoa 1: R\$ _____ por mês Pessoa 2: R\$ _____ por mês Pessoa 3: R\$ _____ por mês Pessoa 4: R\$ _____ por mês Pessoa 5: R\$ _____ por mês TOTAL: _____ (77) Não sabe		Benefícios: Pessoa 1: R\$ _____ por mês Pessoa 2: R\$ _____ por mês Pessoa 3: R\$ _____ por mês Pessoa 4: R\$ _____ por mês Pessoa 5: R\$ _____ por mês TOTAL: _____ (77) Não sabe
		RDRTOTAL _____ RDBTOTAL _____
A50) Você recebeu indicação para tomar algum SUPLEMENTO de vitamina ou mineral durante a gestação? (exemplos: sulfato ferroso, ácido fólico) <i>SE NÃO ou NÃO SABE PULE PARA QUESTÃO A57.</i> (0) Não (1) Sim		
		SUPL _____
SE SIM: outro suplemento não		
A51) Qual o suplemento?		SUPLF _____

- Ferro	(0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA	SUPLA _____	
- Ácido Fólico	(0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA	SUPLO _____	
- Outros, qual(is): _____	(0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA	SUPLQ _____	
A52) Quando iniciou o uso?			
- Ferro	(0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA	SUPLFI _____	
- Ácido Fólico	(0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA	SUPLFP _____	
- Outro	(0) Prévio, desde quando? _____ (1) Na gravidez (2) No pós-parto (7) Não sabe (8) NSA	SUPLAI _____	
		SUPLAP _____	
		SUPLOI _____	
		SUPLOP _____	
A53) Se iniciou durante a gestação, com quantas semanas gestacionais?			
- Ferro	_____ semanas (77) Não sabe (88) NSA	SUPLFIG _____ semanas	
- Ácido Fólico	_____ semanas (77) Não sabe (88) NSA	SUPLAIG _____ semanas	
- Outro	_____ semanas (77) Não sabe (88) NSA	SUPLOIG _____ semanas	
A54) Quando terminou o uso, com quantas semanas gestacionais?			
- Ferro	_____ semanas (66) Não parou na gestação (77) Não sabe (88) NSA	SUPLFTG _____ semanas	
- Ácido Fólico	_____ semanas (66) Não parou na gestação (77) Não sabe (88) NSA	SUPLATG _____ semanas	
- Outro	_____ semanas (66) Não parou na gestação (77) Não sabe (88) NSA	SUPLOTG _____ semanas	
A55) A suplementação teve interrupção de uso?			
(0) Não (1) Sim (7) Não sabe (8) NSA		SUPLI _____	
SE SIM:			
A56) Quanto tempo de interrupção? _____ semanas (77) Não sabe (88) NSA		SUPLIT _____ semanas	
A57) Está utilizando algum suplemento atualmente?			
(0) Não (1) Sim Qual? _____ Vezes por dia: _____		SUPLPP _____	
		SUPLPPQ _____	
		SUPLPPV _____	
A58) Você utilizou algum MEDICAMENTO durante a gestação?			
(0) Não (1) Sim SE NÃO ou NÃO SABE, PULE PARA QUESTÃO A62.		MEDG _____	
SE SIM:			
A59) Nome?	A60) Motivo?	A61) Início do uso?	MEDGQ1 _____
Med 1 _____	Med 1 _____	Med 1 _____	MEDGM1 _____
Med 2 _____	Med 2 _____	Med 2 _____	MEDGT1 _____
Med 3 _____	Med 3 _____	Med 3 _____	MEDGQ2 _____
Med 4 _____	Med 4 _____	Med 4 _____	MEDGM2 _____
Med 5 _____	Med 5 _____	Med 5 _____	MEDGT2 _____
(88) NSA	(88) NSA	(em meses) (88) NSA	MEDGQ3 _____
			MEDGM3 _____
			MEDGT3 _____
A62) Você utiliza atualmente algum MEDICAMENTO?			
(0) Não (1) Sim SE NÃO ou NÃO SABE, PULE PARA QUESTÃO A66.		MED _____	
SE SIM:			
A63) Nome?	A64) Motivo?	A65) Tempo uso?	MEDAQ1 _____
Med 1 _____	Med 1 _____	Med 1 _____	MEDAM1 _____
Med 2 _____	Med 2 _____	Med 2 _____	MEDAT1 _____
Med 3 _____	Med 3 _____	Med 3 _____	MEDAQ2 _____
Med 4 _____	Med 4 _____	Med 4 _____	MEDAM2 _____
Med 5 _____	Med 5 _____	Med 5 _____	MEDAT2 _____
(88) NSA		(em dias)	MEDAQ3 _____
			MEDAM3 _____
			MEDAT3 _____
A66) Você teve infecção urinária na gestação? (0) Não (1) Sim			GIU _____
A67) Você teve outras doenças na gestação? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A69. (0) Não (1) Sim			GDO _____
SE SIM:			
A68) Qual(is) doença(s)? _____		(88) NSA	GDOQ _____

A69) Você foi hospitalizada na gestação? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A72. (0) Não (1) Sim	GHOSP _____
SE SIM:	
A70) Quantos dias? _____ (88) NSA	GHOSPD _____ dias
A71) Por qual(is) motivo(s)? _____ (88) NSA	GHOSPM _____
A72) Como você recebeu e a notícia da sua gravidez?	RECMAE _____
A73) Como o pai da criança recebeu a notícia da sua gravidez?	RECPAI _____
A74) Sua gestação foi planejada? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A75. (0) Não (1) Sim	PLAN _____
SE SIM:	
Intenção ou objetivo de engravidar: (0) Não (1) Sim (8) NSA	PLAN1 _____
Cessaçãõ de método anticoncepcional: (0) Não (1) Sim (8) NSA	PLAN2 _____
Concordância do parceiro: (0) Não (1) Sim (8) NSA	PLAN3 _____
Momento adequado com relação a estilo/estágio de vida: (0) Não (1) Sim (8) NSA	PLAN4 _____
A75) Sua gestação foi por concepção assistida (artificial)? (0) Não (1) Sim SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A77.	PCAS _____
SE SIM:	
A76) Qual foi o método? (0) Inseminação Intra-Uterina (1) Fertilização in vitro (8) NSA	PCASM _____
A77) Você já fumou ou fuma cigarros de tabaco? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A85. (0) Não, nunca fumou (1) Sim, já fumou (2) Sim, fuma atualmente	TAB _____
SE JÁ FUMOU OU FUMA:	
A78) Por quanto tempo fumou ou fuma? _____ meses (88) NSA	TABT _____ meses
A79) Quantos cigarros você fumava ou fuma por dia? _____ cigarros (88) NSA	TABQ _____ cigarros
A80) Se parou de fumar, quanto tempo antes de engravidar? _____ meses (88) NSA	TABP _____ meses
A81) Usa ou usou na gestação medicações específicas para parar de fumar? (0) Não (1) Sim	TABM _____
SE SIM:	
A82) Qual(is) tipo(s) de tratamento(s)? (0) Medicação via oral (1) Goma de mascar (2) Adesivo (3) Outro (8) NSA	TABMQ _____
A83) Se iniciou durante a gestação, com quantas semanas? _____ semanas (88) NSA	TABMI _____ semanas
SE TEVE OUTROS FILHOS:	
A84) Fumou na gestação anterior? (0) Não (1) Sim (88) NSA	TABGA _____
A85) Há alguém que fuma na sua casa (exceto a mãe)? (0) Não (1) Sim SE NÃO PULE PARA QUESTÃO A87.	TABC _____
SE SIM:	
A86) Quantas pessoas em sua casa atualmente fumam (exceto a mãe)? Número de pessoas _____ (88) NSA	TABCP _____
A87) Sua mãe fumou na sua gestação? (0) Não (1) Sim (7) Não sabe	TABMG _____
DADOS DA ALIMENTAÇÃO DA MÃE	
A88) Você já recebeu alguma orientação de como se alimentar? (0) Não (1) Sim SE NÃO PULE PARA A QUESTÃO A91.	PORI _____
SE SIM:	
A89) Essa orientação ocorreu: (1) Antes de engravidar (2) Durante a gestação (3) opções 1 e 2 (8) NSA	PORIM _____
A90) De quem recebeu a orientação? _____ (8) NSA	PORIQ _____

DADOS GERAIS DA CRIANÇA

A91) A criança já tem nome? SE NÃO PULE PARA A QUESTÃO A93. (0) Não (1) Sim		CRNOME _____
SE SIM:		
A92) Qual o nome da criança? _____ (88) NSA		NOMECR _____
A93) Sexo? (0) Feminino (1) Masculino		CSEX _____
A94) Data de nascimento? ____/____/____		CRDN ____/____/____
A95) Número da Declaração de Nascido Vivo (DN)? _____		NUDN _____
A96) Peso ao nascer? _____ gramas		PESOCR _____ g
A97) Comprimento ao nascer? _____ cm		COMPCR _____ cm
A98) Perímetro cefálico? _____ cm		PCCR _____ cm
A99) Apgar1? _____		APGAR1 _____
A100) Apgar5? _____		APGAR5 _____
A101) Tipo de parto? (1) Cesárea (2) Vaginal (3) Fórceps		CTPART _____
A102) Teve mecônio (prontuário)? (0) Não (1) Sim (6) Não tem no prontuário		MECO _____
A103) Hora que a criança nasceu? _____		HRNASC _____
A104) A criança mamou no primeiro dia de vida? (0) Não (1) Sim		MAMOD1 _____
SE NÃO MAMOU NO PEITO:		
A105) O que recebeu? (0) Solução glicosada via oral (1) Soro glicosado endovenoso (2) Fórmula 1º Semestre (3) Outro, qual? _____ (7) Não sabe (8) NSA		MAMO _____ MAMOQ _____
A106) Quantos minutos após nascer a criança mamou no peito pela primeira vez? _____ minutos (5555) mamou após 1º dia (8888) NSA		HRMAMO _____
A107) Peso de nascimento da mãe? _____ gramas (7777) Não sabe		PNM _____ g
A108) Qual era seu peso antes de engravidar? _____ kg (7777) Não sabe		PESOAG _____ kg
A109) Qual foi seu peso no final do 1º trimestre? _____ kg (7777) Não sabe		PESO1T _____ kg
A110) Qual foi seu peso no final do 2º trimestre? _____ kg (7777) Não sabe		PESO2T _____ kg
A111) Qual era seu peso antes do parto? _____ kg (7777) Não sabe		PESOAP _____ kg
A112) Data da última menstruação? ____/____/____ (66) Não tem na carteirinha		DUM ____/____/____
A113) Idade gestacional? IG DUM: _____ IG eco: _____ IG clínico: _____		IGDUM _____ sem. IGECO _____ sem. IGCLI _____ sem.
A114) Ecografias: peso e comprimento fetal aproximado (prontuário) 1º Peso: _____ gramas 2º Peso: _____ 3º Peso: _____ 1º Comprimento: _____ cm 2º Compr.: _____ cm 3º Compr.: _____ cm Data Eco 1º TRI: ____/____/____ Data Eco 2º TRI: ____/____/____ Data Eco 3º TRI: ____/____/____ 1º IG: _____ 2º IG: _____ 3º IG: _____ (8) NSA (8) NSA (8) NSA		ECOP1 _____ g ECOC1 _____ cm ECOD1 ____/____/____ ECOIG1 _____ ECOP2 _____ g ECOC2 _____ cm ECOD2 ____/____/____ ECOIG2 _____ ECOP3 _____ g ECOC3 _____ cm ECOD3 ____/____/____ ECOIG3 _____
A115) Peso da placenta (prontuário)? _____ gramas (66) Não tem esse dado		PESOPL _____ g
A116) Data da primeira consulta do pré-natal? ____/____/____ IG: _____		PCPN ____/____/____

(66) Não tem na carteirinha	PCPNIG _____
A117) Data da última consulta do pré-natal? ____/____/____ IG: _____ (66) Não tem na carteirinha	UCPN ____/____/____ UCPNIG _____
A118) Número de consultas pré-natais? _____ (66) Não tem na carteirinha	NCPN _____
A119) Primeiro nível de PAS e PAD aferido em consulta pré-natal? _____ mmHg x _____ mmHg (66) Não tem na carteirinha Data: ____/____/____ IG: _____	PPASPN _____ PPADPN _____ DPPA ____/____/____ IGPPA _____
A120) Último nível de PAS e PAD aferido em consulta pré-natal? _____ mmHg x _____ mmHg (66) Não tem na carteirinha Data: ____/____/____ IG: _____	UPASPN _____ UPADPN _____ DUPA ____/____/____ IGUPA _____

EXAMES LABORATORIAIS DA MÃE

A121) Últimos exames laboratoriais (prontuário e carteira da gestante)? Colocar 66 se não tem dado		
Tipo sanguíneo da mãe _____ Fator Rh _____ Hematócrito _____ % Hemoglobina _____ g/dl Eritrócito _____ milhões/ul Leucócitos Totais _____ Plaquetas _____ ul Tempo de Tromboplastina Parcial _____ s Tempo de Protrombina _____ s RNI _____ VDRL (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo HBSAg (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo Toxoplasmose IgM (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo Toxoplasmose IgG (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo Rubéola (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo Citomegalovirose (0) Não reagente (1) Reagente (2) Inconclusivo Glicose em jejum _____ mg/dl do primeiro trimestre Glicose em jejum _____ mg/dl do segundo trimestre Glicose em jejum _____ mg/dl do terceiro trimestre TTG 75g (jejum) _____ mg/dl TTG (2h após) _____ mg/dl Colesterol HDL _____ mg/dl Colesterol LDL _____ mg/dl Triglicerídeos _____ mg/dl Colesterol Total _____ mg/dl Aspartato-aminotransferase (TGO) _____ U/L Transaminase glutâmica pirúvica (TGP) _____ U/L Bilirrubina Total _____ mg/dl Ferritina _____ ng/ml Ácido Fólico _____ ng/dl T4 _____ mcg/100ml TSH _____ microUI/ml Creatinina _____ mg/dl Uréia _____ mg/dl Exame qualitativo de urina (0) Não realizou (1) Realizou Urocultura (0) Negativa (1) Positivo Parasitológico de fezes (0) Negativo (1) Positivo Citopatológico - Colo do Útero (0) Negativo (1) Positivo Hemoglobina glicada _____	SABO _____ FRH _____ HEMT _____ HEMG _____ ERIT _____ LEUT _____ PLAQ _____ TTP _____ TP _____ RNI _____ VDRL _____ VHB _____ TOXOM _____ TOXOG _____ RUB _____ CMV _____ GLI1 _____ GLI2 _____ GLI3 _____ TTG1 _____ TTG2 _____ HDL _____ LDL _____ TRIG _____ COLT _____ TGO _____ TGP _____ BILIT _____ FERR _____ ACFO _____ T4 _____ TSH _____ CREA _____ UREIA _____ EQU _____ URO _____ ECF _____ CP _____ HBGLIC _____	

QUESTIONÁRIOS ESPECÍFICOS – GRUPOS

DOENÇA HIPERTENSIVA	
B1) Qual a classificação de sua hipertensão (prontuário)? (1) Pré-eclâmpsia (2) Hipertensão crônica (3) Eclâmpsia (4) Pré-eclâmpsia superposta à HC (5) Hipertensão gestacional (8) NSA	
HIP _____	
SE DIAGNÓSTICO DE HIPERTENSÃO CRÔNICA (HC):	
B2) Quando teve o diagnóstico? _____ anos (88) NSA	HIPDG _____ anos
SE POSSUI HIPERTENSÃO GESTACIONAL, PRÉ-ECLÂMPسيا OU ECLÂMPسيا	
B3) Com quantas semanas gestacionais a HAS foi diagnosticada? _____ semanas (88) NSA	HIP _____ semanas
B4) Maior nível de PAS na internação? _____ mmHg Data: ____/____/____	PAS _____ PASD ____/____/____
B5) Maior nível de PAD na internação? _____ mmHg Data: ____/____/____	PAD _____ PADD ____/____/____
B6) Usou medicações específicas para a hipertensão na gestação? (0) Não (1) Sim <i>SE NÃO PULE PARA QUESTÃO B10.</i>	HIPM _____
SE SIM:	
B7) Qual(is)? _____ (88) NSA	HIPMQ _____
B8) Se iniciou durante a gestação, com quantas semanas? _____ semanas (88) NSA	HIPMI _____ semanas
B9) Se parou durante a gestação, com quantas semanas? _____ semanas (88) NSA	HIPMP _____ semanas
SE TEVE OUTROS FILHOS:	
B10) Teve hipertensão na gestação anterior? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO B13. (0) Não (1) Sim (8) NSA	HIPAN _____
SE SIM:	
B11) Qual era a classificação de sua hipertensão? (1) Pré-eclâmpsia (2) Pré-eclâmpsia superposta à HC (3) Eclâmpsia (4) Hipertensão crônica-HC (5) Hipertensão gestacional (8) NSA	HIPANQ _____
B12) Qual(is) a(s) medicação(ões) que utilizava? _____ (88) NSA	HIPANM _____
B13) Possui histórico familiar de hipertensão? SE NÃO PULE PARA QUESTÃO B15. (0) Não (1) Sim (7) Não sabe	HIPHF _____
SE SIM:	
B14) Qual o parentesco? (1) Mãe (2) Pai (3) Irmãos (4) Irmãs (5) Avós Maternos (6) Avós Paternos (7) Primos (8) Tios (88) NSA	HIPHFQ _____
B15) Sua mãe teve hipertensão na sua gestação? (0) Não (1) Sim (7) Não sabe	HIPMM _____
DIABETES	
D1) Qual a classificação de sua diabetes (prontuário)? (1) DM1 (2) DM2 (3) Diabetes Gestacional (DMG)	
DMCL _____	
SE DIAGNÓSTICO DE DM1 ou DM2:	
D2) Quando teve o diagnóstico? _____ anos (88) NSA	DMD _____ anos
SE POSSUI DIABETES GESTACIONAL (DMG):	
D3) Com quantas semanas gestacionais a DMG foi diagnosticada? _____ semanas (88) NSA	DMGDG _____
SE TEVE OUTROS FILHOS:	
D4) Em gestações anteriores alguma vez você apresentou diabetes? (0) Não (1) Sim (8) NSA	DMGANT _____
SE SIM:	

D5) Em quantas gestações? _____	(88) NSA	DMGANTQ _____
D6) A diabetes persistiu após o parto? (0) Não (1) Sim	(8) NSA	DMGANTP _____
SE SIM:		
D7) A diabetes persistiu por quanto tempo? _____ meses (555) Nunca mais normalizou	(888) NSA	DMGANTPT _____
D8) Que tipo de tratamento foi indicado para o diabetes nesta gestação? (0) nenhum tratamento (1) dieta (2) atividade física (3) insulina (4) hipoglicemiante oral (5) Outros: _____		DMTRAT _____ DMTRATO _____
SE HIPOGLICEMIANTE OU INSULINA:		
D9) Qual(is) medicação(ões)? _____	(88) NSA	DMTRATQ _____
D10) Dose(s) _____	(88) NSA	DMTRATD _____
D11) Você seguiu o tratamento recomendado? (0) Não (2) Às vezes (1) Sim, durante toda a gestação desde o momento do diagnóstico		DMTRATR _____
SE NÃO OU ÀS VEZES:		
D12) Por qual(is) motivo(s)? _____	(88) NSA	DMTRATRM _____
D13) Quantas vezes, nesta gestação, você foi internada para controle glicêmico? Número de vezes: _____		DMCGI _____
SE FOI INTERNADA:		
D14) Por quanto tempo? _____	(88) NSA	DMCGP _____ dias
D15) Durante a gestação você fazia controle da sua glicemia? (0) Não (1) Sim		DMCG _____
SE SIM:		
D16) Qual o método que utilizava no controle da sua glicemia? (1) Fita-teste (2) Exame Laboratorial (3) Ambas (8) NSA		DMCGM _____
D17) Com que frequência monitorava sua glicemia? _____	(88) NSA	DMCGMF _____ semana
D18) Você possui histórico familiar de diabetes? 1. Não (1) Sim (7) Não sabe		DMHF _____
SE SIM:		
D19) Qual o parentesco? (1) Mãe (2) Pai (3) Irmãos (4) Irmãs (5) Avós Maternos (6) Avós Paternos (7) Primos (8) Tios (88) NSA		DMPAR _____

Critério de Classificação Econômica Brasil ABIPEME (ABEP, 2011)

Abaixo, marcar um X sobre o número de itens de cada eletrodoméstico existente na casa em que a gestante mora:

Posse de itens:

Itens	Não tem	Quantidade de itens			
		1	2	3	4
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel (carro ou moto)	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Videocassete/DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer*	0	2	2	2	2

*Aparelho independente ou parte da geladeira duplex

Nomenclatura antiga	Nomenclatura atual	Pontos	Pontuação Mínima: 0 Pontuação Máxima: 46
Analfabeto/Primário incompleto	Analfabeto/até 3ª série fundamental	0	
Primário completo/Ginásial incompleto	4ª série fundamental	1	
Ginásial completo/Colegial incompleto	Fundamental completo	2	
Colegial completo/Superior incompleto	Médio completo	4	
Superior completo	Superior completo	8	

Grau de instrução do chefe da família:

Data da entrevista: ___ / ___ / ___	GDE ___ / ___ / ___
Entrevistador(a): _____	ENTREV ___
Nome da mãe: _____	

QUESTIONÁRIO DE FREQUENCIA ALIMENTAR

Primeiro pergunte: com que frequência você tem comido “nome do alimento”? Caso ela refira consumir o alimento, perguntar: Quantas “ler a medida caseira”? A cada 4 ou 5 alimentos lembrar a puérpera que o questionário se refere a alimentação **durante toda a gestação**.

Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3x/ dia	(3) 1x/ dia	(4) 5 a 6x/ sem.	(5) 2 a 4x/ sem.	(6) 1x/ sem.	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca	
1. Arroz branco	() colher sopa cheia									QFA1Q ___ QFA1F ___
2. Arroz integral	() colher sopa cheia									QFA2Q ___ QFA2F ___
3. Feijão	() concha média									QFA3Q ___ QFA3F ___
4. Macarrão	() escumadeira cheia ou pegador									QFA4Q ___ QFA4F ___
5. Macarrão integral	() escumadeira cheia ou pegador									QFA5Q ___ QFA5F ___
6. Farinha de mandioca	() colher sopa									QFA6Q ___ QFA6F ___
7. Pão cacetinho ou fatiado	() francês/ 2 fatias pão forma									QFA7Q ___ QFA7F ___
8. Pão integral ou ceiteio	() fatia									QFA8Q ___ QFA8F ___
9. Pão caseiro	() fatia									QFA9Q ___ QFA9F ___
10. Biscoito doce	() unidade									QFA10Q ___ QFA10F ___
11. Bolos ouucas	() fatias									QFA11Q ___ QFA11F ___
12. Biscoito salgado	() pacote									QFA12Q ___ QFA12F ___
13. Polenta	() pedaço									QFA13Q ___ QFA13F ___
14. Batata frita ou chips	() porção pequena									QFA14Q ___ QFA14F ___
15. Batata cozida	() unidade									QFA15Q ___ QFA15F ___
16. Mandioca, aipim	() pedaço									QFA16Q ___ QFA16F ___
17. Milho verde	() 1 espiga = 4 colher sopa									QFA17Q ___ QFA17F ___
18. Pipoca	() saco									QFA18Q ___ QFA18F ___
19. Lentilha ou Ervilha ou Grão de bico	() colher sopa									QFA19Q ___ QFA19F ___
20. Alface	() folha									QFA20Q ___ QFA20F ___
21. Couve	() colher sopa cheia									QFA21Q ___ QFA21F ___

Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3x/ dia	(3) 1x/ dia	(4) 5 a 6x/ sem.	(5) 2 a 4x/ sem.	(6) 1x/ sem.	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca	
22. Repolho	() colher sopa cheia									QFA22Q ___ QFA22F ___
23. Laranja/bergamota	() unidade									QFA23Q ___ QFA23F ___
24. Banana	() unidade									QFA24Q ___ QFA24F ___
25. Mamão/Papaia	() fatia / ½									QFA25Q ___ QFA25F ___
26. Maçã	() unidade									QFA26Q ___ QFA26F ___
27. Melancia/Melão	() fatia									QFA27Q ___ QFA27F ___
28. Abacaxi	() fatia									QFA28Q ___ QFA28F ___
29. Abacate	() ½ unidade									QFA29Q ___ QFA29F ___
30. Manga	() unidade									QFA30Q ___ QFA30F ___
31. Limão	Só freqüência.									QFA31F ___
32. Maracujá	Só freqüência.									QFA32F ___
33. Uva	() cacho médio									QFA33Q ___ QFA33F ___
34. Goiaba	() unidade									QFA34Q ___ QFA34F ___
35. Pêra	() pêra									QFA35Q ___ QFA35F ___
36. Chicória	() colher sopa cheia									QFA36Q ___ QFA36F ___
37. Tomate	() unidade									QFA37Q ___ QFA37F ___
38. Chuchu	() colher sopa cheia									QFA38Q ___ QFA38F ___
39. Abóbora	() colher sopa cheia									QFA39Q ___ QFA39F ___
40. Abobrinha	() colher sopa cheia									QFA40Q ___ QFA40F ___
41. Pepino	() fatia									QFA41Q ___ QFA41F ___
42. Vagem	() colher sopa cheia									QFA42Q ___ QFA42F ___
43. Cebola	Só freqüência.									QFA43F ___
44. Alho	Só freqüência.									QFA44F ___
45. Pimentão	Só freqüência.									QFA45F ___
46. Cenoura	() colher sopa cheia									QFA46Q ___ QFA46F ___
47. Beterraba	() fatia									QFA47Q ___ QFA47F ___
48. Couve-flor	() ramo/flor									QFA48Q ___ QFA48F ___
49. Ovos	() unidades									QFA49Q ___ QFA49F ___
50. Leite Integral	() copo									QFA50Q ___ QFA50F ___
51. Leite Semi-desnatado	() copo									QFA51Q ___ QFA51F ___
52. Leite Desnatado	() copo									QFA52Q ___ QFA52F ___
53. Iogurte Normal	() unidade									QFA53Q ___ QFA53F ___

Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3x/dia	(3) 1x/dia	(4) 5 a 6x/sem.	(5) 2 a 4x/sem.	(6) 1x/sem.	(7) 1 a 3x/mês	(8) Nunca ou quase nunca	
54. Iogurte light	() unidade									QFA54Q ___ QFA54F ___
55. Queijo	() fatia média									QFA55Q ___ QFA55F ___
56. Requeijão	Só frequência.									QFA56F ___
57. Manteiga	Só frequência.									QFA57F ___
58. Margarina	Só frequência.									QFA58F ___
59. Vísceras: fígado, coração, bucho	() pedaço									QFA59Q ___ QFA59F ___
60. Carne de boi sem osso	() 1 bife médio = 4 colheres sopa ou 2 pedaços									QFA60Q ___ QFA60F ___
61. Carne de boi com osso	() pedaço									QFA61Q ___ QFA61F ___
62. Carne porco	() pedaço									QFA62Q ___ QFA62F ___
63. Frango	() pedaço									QFA63Q ___ QFA63F ___
64. Salsicha/lingüiça	() unidade ou gomo									QFA64Q ___ QFA64F ___
65. Peixe fresco branco (merluza, pescada, corvina) Qual? _____ Preparo? _____	() filé									QFA65 ___ QFA65P ___ QFA65Q ___ QFA65F ___
66. Peixe fresco oleoso (salmão, atum, sardinha) Qual? _____ Preparo? _____	() filé									QFA66 ___ QFA66P ___ QFA66Q ___ QFA66F ___
67. Atum enlatado	() latas									QFA67Q ___ QFA67F ___
68. Sardinha enlatada	() latas									QFA68Q ___ QFA68F ___
69. Hambúrguer	() unidades									QFA69Q ___ QFA69F ___
70. Pizza	() pedaço									QFA70Q ___ QFA70F ___
71. Camarão	() unidade									QFA71Q ___ QFA71F ___
72. Bacon/toucinho	() fatia									QFA72Q ___ QFA72F ___
73. Maionese	() colher chá									QFA73Q ___ QFA73F ___
74. Salgados: kibe, pastel	() unidades									QFA74Q ___ QFA74F ___
75. Salgadinhos	() pacote									QFA75Q ___ QFA75F ___
76. Sorvete	() unidades									QFA76Q ___ QFA76F ___
77. Açúcar	() colher sobremesa									QFA77Q ___ QFA77F ___
78. Caramelos, bala	Só frequência.									QFA78F ___
79. Chocolate pó/Nescau	() colher sobremesa									QFA79Q ___ QFA79F ___
80. Chocolate barra/ Bombom	() 1 pequeno ou 2 bombons									QFA80Q ___ QFA80F ___

Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3x/ dia	(3) 1x/ dia	(4) 5 a 6x/ sem.	(5) 2 a 4x/ sem.	(6) 1x/ sem.	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca	
81. Pudim	() pedaço									QFA81Q ____ QFA81F ____
82. Doce de leite/Geléia	() colher sobremesa									QFA82Q ____ QFA82F ____
83. Refrigerante normal	() copo									QFA83Q ____ QFA83F ____
84. Refrigerante light	() copo									QFA84Q ____ QFA84F ____
85. Café	() xícara									QFA85Q ____ QFA85F ____
86. Suco natural	() copo									QFA86Q ____ QFA86F ____
87. Suco artificial (pó)	() copo									QFA87Q ____ QFA87F ____
88. Vinho	() copo									QFA88Q ____ QFA88F ____
89. Cerveja	() copo									QFA89Q ____ QFA89F ____
90. Outras bebidas alcoólicas	() dose									QFA90Q ____ QFA90F ____
91. Óleo utilizado para temperar saladas Qual? _____	() colher de sopa									QFA91T ____ QFA91Q ____ QFA91F ____
92. Óleo utilizado para cozinhar Qual? _____	() colher de sopa									QFA92T ____ QFA92Q ____ QFA92F ____
93. Banha de porco	() colher de sopa									QFA93Q ____ QFA93F ____
94. Adoçante gotas/ pó Marca? _____	() gotas () envelope									QFA94M ____ QFA94Q ____ QFA94F ____
95. Linhaça	() colher de sopa rasa									QFA95Q ____ QFA95F ____
96. Oleaginosas (castanhas, nozes, amendoim) Qual? _____	() punhado									QFA96Q ____ QFA96F ____ QFA96T ____

Alimentos não mencionados:

Existe algum alimento que habitualmente era consumido por você durante a gestação e não foi mencionado?

Alimento	Quantidade consumida por vez	(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca	
97. Cápsula de óleo Qual? _____ Dosagem? _____										QFA97Q ____ QFA96D ____ QFA96F ____
98. _____										QFA98A ____ QFA98Q ____ QFA98F ____
99. _____										QFA99A ____ QFA99Q ____ QFA99F ____

Questões adicionais:

100. Quanto tempo dura 1 pacote de sal (1kg)? _____ dias.									QFA100CD ____
101. Qual é seu consumo mensal de óleo? _____ litros. Qual óleo? _____									QFA101CD ____
102. Qual é o seu consumo mensal de banha de porco? _____ Kg.									QFA102CD ____
103. Com que frequência você costumava comer VERDURAS e LEGUMES crus, cozidos ou refogados, sem incluir batatas, mandioca/aipim, inhame e cará?									QFA103 ____
(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca		
104. Com que frequência você costumava comer FRUTAS , sem incluir sucos de frutas?									QFA104 ____
(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca		
105. Com que frequência você costuma comer FAST FOOD (pizza, quibe, coxinha, hambúrguer)?									QFA105 ____
(1) Mais de 3 x/dia	(2) 2 a 3 x /dia	(3) 1 x /dia	(4) 5 a 6 x/ semana	(5) 2 a 4 x/ semana	(6) 1 x/ semana	(7) 1 a 3x/ mês	(8) Nunca ou quase nunca		

REFERÊNCIAS

- Agostoni C (2010) Docosahexaenoic acid (DHA): from the maternal-foetal dyad to the complementary feeding period. *Early Hum Dev* **86 Suppl 1**, 3-6.
- Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J & Kogan M (1996) A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* **87**, 163-168.
- Almeida ME, Queiroz JH, Costa NMB & Matta SLP (2011) Lipídeos séricos e morfologia hepática de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas (óleo de soja, gordura de peixe e porco, margarina e manteiga). *Rev. Nutr., Campinas* **24**, 143-152.
- Alves E, Azevedo A, Rodrigues T, Santos AC & Barros H (2013) Impact of risk factors on hypertensive disorders in pregnancy, in primiparae and multiparae. *Ann Hum Biol.*
- Anderson GJ & Connor WE (1994) Accretion of n-3 fatty acids in the brain and retina of chicks fed a low-linolenic acid diet supplemented with docosahexaenoic acid. *Am J Clin Nutr* **59**, 1338-1346.
- Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa A (2011) Critério de classificação econômica.: <http://www.abep.org/novo/>.
- Ayres C, Agranonik M, Portella A, Filion F, Johnston C & Silveira P (2011) 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* **2**.
- Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC & Silveira PP (2012) Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr* **2012**, 657379.
- Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA & Goldani MZ (2009) Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res* **65**, 215-220.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T & Osmond C (2002) Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* **31**, 1235-1239.
- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B & Simmonds SJ (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* **2**, 577-580.
- Barros AJ, Santos IS, Matijasevich A, Araujo CL, Gigante DP, Menezes AM, Horta BL, Tomasi E, Victora CG & Barros FC (2008a) Methods used in the 1982, 1993, and 2004 birth cohort studies from Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil, and a description of the socioeconomic conditions of participants' families. *Cad Saude Publica* **24 Suppl 3**, S371-380.
- Barros FC, Victora CG, Horta BL & Gigante DP (2008b) [Methodology of the Pelotas birth cohort study from 1982 to 2004-5, Southern Brazil]. *Rev Saude Publica* **42 Suppl 2**, 7-15.
- Bellinger L, Lilley C & Langley-Evans SC (2004) Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr* **92**, 513-520.
- Benjamin SE, Rifas-Shiman SL, Taveras EM, Haines J, Finkelstein J, Kleinman K & Gillman MW (2009) Early child care and adiposity at ages 1 and 3 years. *Pediatrics* **124**, 555-562.
- Bernardi JR, Ferreira CF, Nunes M, da Silva CH, Bosa VL, Silveira PP & Goldani MZ (2012) Impact of Perinatal Different Intrauterine Environments on Child Growth and Development in the First Six Months of Life--IVAPSA Birth Cohort: rationale, design, and methods. *BMC Pregnancy Childbirth* **12**, 25.
- Blake WL & Clarke SD (1990) Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J Nutr* **120**, 1727-1729.
- Bligh EG & Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.

- Bloomfield FH, Oliver MH, Giannoulis CD, Gluckman PD, Harding JE & Challis JR (2003) Brief undernutrition in late-gestation sheep programs the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult offspring. *Endocrinology* **144**, 2933-2940.
- Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM & Verin AD (2005) Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* **69**, 107-127.
- Bourre JM (2004) Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J Nutr Health Aging* **8**, 163-174.
- Bradley RL & Cheatham B (1999) Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* **48**, 272-278.
- Brash AR (2001) Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest* **107**, 1339-1345.
- Brenseke B, Prater MR, Bahamonde J & Gutierrez JC (2013) Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. *J Pregnancy* **2013**, 368461.
- Callegari-jacques SM (2003) *Bioestatística - Princípios e Aplicações*.
- Campbell FM, Clohessy AM, Gordon MJ, Page KR & Dutta-Roy AK (1997) Uptake of long chain fatty acids by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells: role of plasma membrane fatty acid-binding protein. *J Lipid Res* **38**, 2558-2568.
- Cancelas J, Prieto PG, Villanueva-Penacarrillo ML, Zhang Y, Portois L, Sener A, Carpentier YA, Valverde I & Malaisse WJ (2007) Glucose intolerance associated to insulin resistance and increased insulin secretion in rats depleted in long-chain omega3 fatty acids. *Horm Metab Res* **39**, 823-825.
- Cardoso V & Brisa G (2010) Factores Etiológicos Del Parto Pretérmino Y Consecuencias Sobre El Crecimiento: Cohortes de Nacimiento En Dos Ciudades Brasileñas. *12° Encuentro Nacional de Investigación Pediátrica: 20-21 May 2010; Bariloche* **34**.
- Cardoso VC, Simoes VM, Barbieri MA, Silva AA, Bettiol H, Alves MT & Goldani MZ (2007) Profile of three Brazilian birth cohort studies in Ribeirao Preto, SP and Sao Luis, MA. *Braz J Med Biol Res* **40**, 1165-1176.
- Cardozo LF, Soares LL, Chagas MA & Boaventura GT (2010) Maternal consumption of flaxseed during lactation affects weight and hemoglobin level of offspring in rats. *J Pediatr (Rio J)* **86**, 126-130.
- Chaim S, Oliveira Sd & K A (2008) Pregnancy-induced hypertension and the neonatal outcome. *Acta Paul Enferm* **21**, 53-58.
- Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L & Hanson RW (2005) Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 129-154.
- Clarke G, O'Mahony SM, Hennessy AA, Ross P, Stanton C, Cryan JF & Dinan TG (2009) Chain reactions: early-life stress alters the metabolic profile of plasma polyunsaturated fatty acids in adulthood. *Behav Brain Res* **205**, 319-321.
- Connor WE (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* **71**, 171S-175S.
- Davies AA, Smith GD, Ben-Shlomo Y & Litchfield P (2004) Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees. *Circulation* **110**, 1258-1262.
- de Bie HM, Oostrom KJ & Delemarre-van de Waal HA (2010) Brain development, intelligence and cognitive outcome in children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* **73**, 6-14.
- De Farias Aragao VM, Barbieri MA, Moura Da Silva AA, Bettiol H & Ribeiro VS (2005) Risk factors for intrauterine growth restriction: a comparison between two Brazilian cities. *Pediatr Res* **57**, 674-679.
- De Pergola G, Giorgino F, Benigno R, Guida P & Giorgino R (2008) Independent influence of insulin, catecholamines, and thyroid hormones on metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 2405-2411.

- Delgado-Noguera MF, Calvache JA & Bonfill Cosp X (2010) Supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) to breastfeeding mothers for improving child growth and development. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007901.
- Desai M, Gayle D, Babu J & Ross MG (2007) The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am J Obstet Gynecol* **196**, 555 e551-557.
- Despres JP & Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881-887.
- Dias JP & Couture R (2012) Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* **14**, 244-253.
- Dietz PM, Callaghan WM & Sharma AJ (2009) High pregnancy weight gain and risk of excessive fetal growth. *Am J Obstet Gynecol* **201**, 51 e51-56.
- Dirix CE, Kester AD & Hornstra G (2009) Associations between neonatal birth dimensions and maternal essential and trans fatty acid contents during pregnancy and at delivery. *Br J Nutr* **101**, 399-407.
- Djousse L, Matthan NR, Lichtenstein AH & Gaziano JM (2012a) Red blood cell membrane concentration of cis-palmitoleic and cis-vaccenic acids and risk of coronary heart disease. *Am J Cardiol* **110**, 539-544.
- Djousse L, Weir NL, Hanson NQ, Tsai MY & Gaziano JM (2012b) Plasma phospholipid concentration of cis-palmitoleic acid and risk of heart failure. *Circ Heart Fail* **5**, 703-709.
- Dode MS & González D (2010) Anthropometry from birth to 24 months among offspring of women with gestational diabetes: 2004 Pelotas Birth Cohort. *J Dev Orig Health Dis* **2**, 1-8.
- Drouillet P, Kaminski M, De Lauzon-Guillain B, Forhan A, Ducimetiere P, Schweitzer M, Magnin G, Goua V, Thiebaugeorges O & Charles MA (2009) Association between maternal seafood consumption before pregnancy and fetal growth: evidence for an association in overweight women. The EDEN mother-child cohort. *Paediatr Perinat Epidemiol* **23**, 76-86.
- Dupont JL (2009) Research in the Agricultural Research Service/USDA: introduction and early history. *J Nutr* **139**, 171-172.
- Dutta-Roy AK (2000) Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr* **71**, 315S-322S.
- Emken EA, Adlof RO & Gulley RM (1994) Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta* **1213**, 277-288.
- Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A & Klein S (2009) Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15430-15435.
- Farkas S, Hussein J, Ariano RE, Sitar DS & Hasan SU (2006) Prenatal cigarette smoke exposure: pregnancy outcome and gestational changes in plasma nicotine concentration, hematocrit, and carboxyhemoglobin in a newly standardized rat model. *Toxicol Appl Pharmacol* **214**, 118-125.
- Ferreira CF, Bernardi JR, Krolow R, Arcego DM, Fries GR, de Aguiar BW, Senter G, Kapczinski FP, Silveira PP & Dalmaiz C (2013) Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **107**, 11-19.
- Fisberg R, Slater B, Marchioni D & Martini L (2005) *Inquéritos alimentares: métodos e bases científicas*. Barueri, São Paulo.: Manole.
- Franke K, Harder T, Aerts L, Melchior K, Fahrenkrog S, Rodekamp E, Ziska T, Van Assche FA, Dudenhausen JW & Plagemann A (2005) 'Programming' of orexigenic and anorexigenic

- hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats. *Brain Res* **1031**, 276-283.
- Galão A, Soder A, Gerhardt M, Faertes T, MS MK, DF DP & Borba C (2009) Efeitos do fumo materno durante a gestação e complicações perinatais. *Rev HCPA* **29**, 218-224.
- Gebauer SK, Psota TL, Harris WS & Kris-Etherton PM (2006) n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* **83**, 1526S-1535S.
- George ED, Bordner KA, Elwafi HM & Simen AA (2010) Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neurosci* **11**, 123.
- Giacomello A, Schmidt ML, Nunes MAA, Duncan BB, Soares RM, Manzolli P & Camey S (2008) Validação Relativa de um Questionário de Frequência Alimentar em gestantes usuárias de serviços do Sistema Único de Saúde em dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife* **8**, 445-454.
- Glatt SJ, Bolanos CA, Trksak GH, Crowder-Dupont C & Jackson D (2000) Prenatal cocaine exposure alters behavioral and neurochemical sensitization to amphetamine in adult rats. *Neuropharmacology* **39**, 599-610.
- Gluckman PD & Hanson MA (2004a) Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* **56**, 311-317.
- Gluckman PD & Hanson MA (2004b) The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 183-187.
- Gluckman PD & Hanson MA (2007) Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med* **261**, 461-471.
- Gluckman PD & Hanson MA (2008) Developmental and epigenetic pathways to obesity: an evolutionary-developmental perspective. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**, S62-71.
- Goldani MZ, Bettiol H, Barbieri MA & Tomkins A (2000) Maternal age, social changes, and pregnancy outcome in Ribeirao Preto, southeast Brazil, in 1978-79 and 1994. *Cad Saude Publica* **16**, 1041-1047.
- Guesnet P & Alessandri JM (2011) Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie* **93**, 7-12.
- Guo X, Li H, Xu H, Halim V, Zhang W, Wang H, Ong KT, Woo SL, Walzem RL, Mashek DG, Dong H, Lu F, Wei L, Huo Y & Wu C (2012) Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS One* **7**, e39286.
- Haag M & Dippenaar NG (2005) Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Med Sci Monit* **11**, RA359-367.
- Hales CN & Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.
- Harris WS, Connor WE & Lindsey S (1984) Will dietary omega-3 fatty acids change the composition of human milk? *Am J Clin Nutr* **40**, 780-785.
- Hartman L & Lago RC (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* **22**, 475-476 passim.
- Heird WC & Lapillonne A (2005) The role of essential fatty acids in development. *Annu Rev Nutr* **25**, 549-571.
- Helland IB, Saarem K, Saugstad OD & Drevon CA (1998) Fatty acid composition in maternal milk and plasma during supplementation with cod liver oil. *Eur J Clin Nutr* **52**, 839-845.
- Hernandez AR, Silva CH, Agranonik M, Quadros FM & Goldani MZ (2011) [Analysis of infant mortality trends and risk factors in Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil, 1996-2008]. *Cad Saude Publica* **27**, 2188-2196.
- Hibbeln JR, Nieminen LR, Blasbalg TL, Riggs JA & Lands WE (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr* **83**, 1483S-1493S.

- Hodge AM, English DR, O'Dea K, Sinclair AJ, Makrides M, Gibson RA & Giles GG (2007) Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *Am J Clin Nutr* **86**, 189-197.
- Holt R (2003) The Food and Agriculture Organization/World Health Organization expert report on diet, nutrition and prevention of chronic diseases. *Diabetes Obes Metab* **5**, 354.
- Huffman SL, Harika RK, Eilander A & Osendarp SJ (2011) Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review. *Matern Child Nutr* **7 Suppl 3**, 44-65.
- Huh SY, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Taveras EM & Gillman MW (2010) Prospective association between milk intake and adiposity in preschool-aged children. *J Am Diet Assoc* **110**, 563-570.
- Inoue K, Kishida K, Hirata A, Funahashi T & Shimomura I (2013) Low serum eicosapentaenoic acid / arachidonic acid ratio in male subjects with visceral obesity. *Nutr Metab (Lond)* **10**, 25.
- Jaddoe VW, Mackenbach JP, Moll HA, Steegers EA, Tiemeier H, Verhulst FC, Witteman JC & Hofman A (2006) The Generation R Study: Design and cohort profile. *Eur J Epidemiol* **21**, 475-484.
- Jaddoe VW, van Duijn CM, Franco OH, van der Heijden AJ, van Iizendoorn MH, de Jongste JC, van der Lugt A, Mackenbach JP, Moll HA, Raat H, Rivadeneira F, Steegers EA, Tiemeier H, Uitterlinden AG, Verhulst FC & Hofman A (2012) The Generation R Study: design and cohort update 2012. *Eur J Epidemiol* **27**, 739-756.
- Jaddoe VW, van Duijn CM, van der Heijden AJ, Mackenbach JP, Moll HA, Steegers EA, Tiemeier H, Uitterlinden AG, Verhulst FC & Hofman A (2008) The Generation R Study: design and cohort update until the age of 4 years. *Eur J Epidemiol* **23**, 801-811.
- Jaddoe VW, van Duijn CM, van der Heijden AJ, Mackenbach JP, Moll HA, Steegers EA, Tiemeier H, Uitterlinden AG, Verhulst FC & Hofman A (2010) The Generation R Study: design and cohort update 2010. *Eur J Epidemiol* **25**, 823-841.
- Jahng JW (2011) An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Horm Behav* **59**, 213-220.
- Jensen DM, Ovesen P, Beck-Nielsen H, Molsted-Pedersen L, Sorensen B, Vinter C & Damm P (2005) Gestational weight gain and pregnancy outcomes in 481 obese glucose-tolerant women. *Diabetes Care* **28**, 2118-2122.
- Jones A, Beda A, Ward AM, Osmond C, Phillips DI, Moore VM & Simpson DM (2007) Size at birth and autonomic function during psychological stress. *Hypertension* **49**, 548-555.
- Jones A, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulden P & Phillips DI (2006) Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1868-1871.
- Jordan RG (2010) Prenatal omega-3 fatty acids: review and recommendations. *J Midwifery Womens Health* **55**, 520-528.
- Jump DB & Clarke SD (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* **19**, 63-90.
- Kac G & Velasquez-Melendez G (2005) [Gestational weight gain and macrosomia in a cohort of mothers and their children]. *J Pediatr (Rio J)* **81**, 47-53.
- Kahl KG, Greggersen W, Schweiger U, Cordes J, Balijepalli C, Losch C & Moebus S (2012) Prevalence of the metabolic syndrome in unipolar major depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **262**, 313-320.
- Kamel KS (2012) Prenatal Effects of Different Intra-Uterine Milieus on Fetal Glucose Sensing Mechanisms during Gestation in Rats. *J Diabetes Metab* **3**.
- Kang J, Holland M, Jones H & Kaysen GA (1999) Coordinate augmentation in expression of genes encoding transcription factors and liver secretory proteins in hypo-oncotic states. *Kidney Int* **56**, 452-460.

- Kaufman D, Banerji MA, Shorman I, Smith EL, Coplan JD, Rosenblum LA & Kral JG (2007) Early-life stress and the development of obesity and insulin resistance in juvenile bonnet macaques. *Diabetes* **56**, 1382-1386.
- Kim HW, Rao JS, Rapoport SI & Igarashi M (2011) Regulation of rat brain polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism during graded dietary n-3 PUFA deprivation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **85**, 361-368.
- Kim OY, Lim HH, Lee MJ, Kim JY & Lee JH (2013) Association of fatty acid composition in serum phospholipids with metabolic syndrome and arterial stiffness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23**, 366-374.
- Kleinman KP, Oken E, Radesky JS, Rich-Edwards JW, Peterson KE & Gillman MW (2007) How should gestational weight gain be assessed? A comparison of existing methods and a novel method, area under the weight gain curve. *Int J Epidemiol* **36**, 1275-1282.
- Kotronen A, Velagapudi VR, Yetukuri L, Westerbacka J, Bergholm R, Ekroos K, Makkonen J, Taskinen MR, Oresic M & Yki-Jarvinen H (2009) Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia* **52**, 684-690.
- Kozyrskyj A, Zeng Y, Colman I, HayGlass K & Sellers E (2011) Maternal distress in early life predicts the waist-to-hip ratio in schoolchildren. *J DOHaD* **2**, 72-80.
- Kramer MS, Platt RW, Wen SW, Joseph KS, Allen A, Abrahamowicz M, Blondel B & Breart G (2001) A new and improved population-based Canadian reference for birth weight for gestational age. *Pediatrics* **108**, E35.
- Kuhn CM, Butler SR & Schanberg SM (1978) Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science* **201**, 1034-1036.
- Kurotani K, Sato M, Ejima Y, Nanri A, Yi S, Pham NM, Akter S, Poudel-Tandukar K, Kimura Y, Imaizumi K & Mizoue T (2012) High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo-gamma-linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. *Nutr Res* **32**, 669-675 e663.
- Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW & Jahng JW (2007a) Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* **58**, 32-39.
- Lee MJ, Yang RZ, Gong DW & Fried SK (2007b) Feeding and insulin increase leptin translation. Importance of the leptin mRNA untranslated regions. *J Biol Chem* **282**, 72-80.
- Lemaitre-Delaunay D, Pachioudi C, Laville M, Pousin J, Armstrong M & Lagarde M (1999) Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine. *J Lipid Res* **40**, 1867-1874.
- Lepage G & Roy CC (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* **27**, 114-120.
- Levy RB, Claro RM, Mondini L, Sichieri R & Monteiro CA (2012) Regional and socioeconomic distribution of household food availability in Brazil, in 2008-2009. *Rev Saude Publica* **46**, 6-15.
- Lewis SJ, Leary S, Davey Smith G & Ness A (2009) Body composition at age 9 years, maternal folate intake during pregnancy and methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genotype. *Br J Nutr* **102**, 493-496.
- Liang C, DeCourcy K & Prater MR (2010) High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism* **59**, 943-950.
- Liang C, Oest ME & Prater MR (2009) Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **86**, 377-384.
- Lin PY & Su KP (2007) A meta-analytic review of double-blind, placebo-controlled trials of antidepressant efficacy of omega-3 fatty acids. *J Clin Psychiatry* **68**, 1056-1061.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-408.

- Lovejoy JC, Champagne CM, Smith SR, DeLany JP, Bray GA, Lefevre M, Denkins YM & Rood JC (2001) Relationship of dietary fat and serum cholesterol ester and phospholipid fatty acids to markers of insulin resistance in men and women with a range of glucose tolerance. *Metabolism* **50**, 86-92.
- Lucas A (1991) Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* **156**, 38-50; discussion 50-35.
- Lucas F, Ackroff K & Sclafani A (1989) Dietary fat-induced hyperphagia in rats as a function of fat type and physical form. *Physiol Behav* **45**, 937-946.
- Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM & Roseboom TJ (2008) Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* **88**, 1648-1652.
- Macdonald-Wallis C, Tilling K, Fraser A, Nelson SM & Lawlor DA (2013) Gestational weight gain as a risk factor for hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*.
- Malaisse WJ, Bulur N, Zhang Y, Hacquebard M, Portois L, Sener A & Carpentier YA (2009) The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. I. Liver data. *Int J Mol Med* **24**, 111-123.
- Manco M, Calvani M & Mingrone G (2004) Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab* **6**, 402-413.
- Maniam J & Morris MJ (2010) Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* **35**, 717-728.
- Marques A, Hautrive T, Moura Gd, Callegaro MdG & Hecktheuer L (2011) Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes formas de preparo na resposta biológica em ratos. *Rev. Nutr. [online]* **24**, 131-141.
- Marszalek JR & Lodish HF (2005) Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 633-657.
- Martin C, Almeida V, Ruiz M, JELVisentainer, Matshushita M, Souza N & Visentainer J (2006) Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr., Campinas* **19**, 761-770.
- Martin RM, McCarthy A, Smith GD, Davies DP & Ben-Shlomo Y (2003) Infant nutrition and blood pressure in early adulthood: the Barry Caerphilly Growth study. *Am J Clin Nutr* **77**, 1489-1497.
- Martinez M (1992) Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* **120**, S129-138.
- Martins EB & Carvalho MS (2006) [Birth weight and overweight in childhood: a systematic review]. *Cad Saude Publica* **22**, 2281-2300.
- Martins JG (2009) EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Nutr* **28**, 525-542.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR & Flier JS (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* **294**, 2166-2170.
- Mathers JC (2007) Early nutrition: impact on epigenetics. *Forum Nutr* **60**, 42-48.
- Mathieu G, Denis S, Lavalie M & Vancassel S (2008) Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **78**, 391-401.
- Mathieu G, Oualian C, Denis I, Lavalie M, Gisquet-Verrier P & Vancassel S (2011) 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* **85**, 129-136.

- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-419.
- McEwen BS (2002) Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* **23**, 921-939.
- Melere C, Hoffmann JF, Nunes MA, Drehmer M, Buss C, Ozcariz SG, Soares RM, Manzolli PP, Duncan BB & Camey SA (2013) Healthy eating index for pregnancy: adaptation for use in pregnant women in Brazil. *Rev Saude Publica* **47**, 20-28.
- Michaelsen KF, Dewey KG, Perez-Exposito AB, Nurhasan M, Lauritzen L & Roos N (2011) Food sources and intake of n-6 and n-3 fatty acids in low-income countries with emphasis on infants, young children (6-24 months), and pregnant and lactating women. *Matern Child Nutr* **7 Suppl 2**, 124-140.
- Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS & Hotamisligil GS (2010) Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am J Clin Nutr* **92**, 1350-1358.
- Muthalif MM, Benter IF, Karzoun N, Fatima S, Harper J, Uddin MR & Malik KU (1998) 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid mediates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12701-12706.
- Oken E & Belfort MB (2010) Fish, fish oil, and pregnancy. *JAMA* **304**, 1717-1718.
- Olsen SF, Grandjean P, Weihe P & Videro T (1993) Frequency of seafood intake in pregnancy as a determinant of birth weight: evidence for a dose dependent relationship. *J Epidemiol Community Health* **47**, 436-440.
- Olsen SF & Secher NJ (2002) Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *BMJ* **324**, 447.
- OMS OMDs (1998) Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde. In *CID-10*, pp. 1184. São Paulo.: EDUSP.
- Orlandi SP, Schneider BC, Gonzalez MC, Gonzalez-Chica DA & Assuncao MC (2013) [Early nutritional determinants of fat-free mass in early adulthood: a systematic review]. *Cad Saude Publica* **29**, 639-653.
- Paillard F, Catheline D, Duff FL, Bouriel M, Deugnier Y, Pouchard M, Daubert JC & Legrand P (2008) Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **18**, 436-440.
- Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, de Groot E, Stok WJ, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP & Roseboom TJ (2007) Maternal nutrition during gestation and carotid arterial compliance in the adult offspring: the Dutch famine birth cohort. *J Hypertens* **25**, 533-540.
- Pan A, Keum N, Okereke OI, Sun Q, Kivimaki M, Rubin RR & Hu FB (2012) Bidirectional association between depression and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Diabetes Care* **35**, 1171-1180.
- Patel PS, Sharp SJ, Jansen E, Luben RN, Khaw KT, Wareham NJ & Forouhi NG (2010) Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: a pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort. *Am J Clin Nutr* **92**, 1214-1222.
- Pfaffl MW & Windisch W (2003) Influence of zinc deficiency on the mRNA expression of zinc transporters in adult rats. *J Trace Elem Med Biol* **17**, 97-106.
- Pinheiro A, Lacerda E, Benzecky E, Gomes M & VM VC (2004) *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*. São Paulo.

- Plotsky PM & Meaney MJ (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* **18**, 195-200.
- Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH & Tamashiro KL (2011) Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* **104**, 474-479.
- Raposo H (2010) Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. *Rev. Nutr. [online]* **23**.
- Reynolds RM (2013) Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis--2012 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* **38**, 1-11.
- Rice F, Harold GT & Thapar A (2006) The effect of birth-weight with genetic susceptibility on depressive symptoms in childhood and adolescence. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **15**, 383-391.
- Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Oken E & Gillman MW (2009) Dietary quality during pregnancy varies by maternal characteristics in Project Viva: a US cohort. *J Am Diet Assoc* **109**, 1004-1011.
- Rkhezay-Jaf J, O'Dowd JF & Stocker CJ (2012) Maternal Obesity and the Fetal Origins of the Metabolic Syndrome. *Curr Cardiovasc Risk Rep* **6**, 487-495.
- Rombaldi Bernardi J, de Souza Escobar R, Ferreira CF & Pelufo Silveira P (2012) Fetal and neonatal levels of omega-3: effects on neurodevelopment, nutrition, and growth. *ScientificWorldJournal* **2012**, 202473.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ & Shapses SA (2011) The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 53-58.
- Ross BM, Seguin J & Sieswerda LE (2007) Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids Health Dis* **6**, 21.
- Ryan JP, Sheu LK, Critchley HD & Gianaros PJ (2012) A neural circuitry linking insulin resistance to depressed mood. *Psychosom Med* **74**, 476-482.
- Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R & Lottenberg AMPea (2013) I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol* **100**, 1040.
- Schmidt MI, Matos MC, Reichelt AJ, Forti AC, de Lima L & Duncan BB (2000) Prevalence of gestational diabetes mellitus--do the new WHO criteria make a difference? Brazilian Gestational Diabetes Study Group. *Diabet Med* **17**, 376-380.
- Seckl JR (2004) Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* **151 Suppl 3**, U49-62.
- Sener A, Zhang Y, Bulur N, Louchami K, Malaisse WJ & Carpentier YA (2009) The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. II. Body weight, adipose tissue mass and glycemic homeostasis. *Int J Mol Med* **24**, 125-129.
- Seo T, Qi K, Chang C, Liu Y, Worgall TS, Ramakrishnan R & Deckelbaum RJ (2005) Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J Clin Invest* **115**, 2214-2222.
- Seppala J, Vanhala M, Kautiainen H, Eriksson J, Kampman O, Mantyselka P, Oksa H, Ovaskainen Y, Viikki M & Koponen H (2012) Prevalence of metabolic syndrome in subjects with melancholic and non-melancholic depressive symptoms. A Finnish population-based study. *J Affect Disord* **136**, 543-549.
- Shea AK, Streiner DL, Fleming A, Kamath MV, Broad K & Steiner M (2007) The effect of depression, anxiety and early life trauma on the cortisol awakening response during pregnancy: preliminary results. *Psychoneuroendocrinology* **32**, 1013-1020.

- Silveira PP, Agranonik M, Faras H, Portella AK, Meaney MJ & Levitan RD (2012) Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. *Pediatr Res* **71**, 293-298.
- Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ & Barbieri MA (2007) Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr (Rio J)* **83**, 494-504.
- Simopoulos AP (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**, 674-688.
- Singh RB, Pella D, Mechirova V & Otsuka K (2004) Can brain dysfunction be a predisposing factor for metabolic syndrome? *Biomed Pharmacother* **58 Suppl 1**, S56-68.
- Soyalan B, Minn J, Schmitz HJ, Schrenk D, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G & Janzowski C (2011) Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver. *Eur J Nutr* **50**, 135-143.
- Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, Lottenberg AM, Chacra AP, Faludi AA, Loures-Vale AA, Carvalho AC, Duncan B, Gelonese B, Polanczyk C, Rodrigues Sobrinho CR, Scherr C, Karla C, Armaganijan D, Moriguchi E, Saraiva F, Pichetti G, Xavier HT, Chaves H, Borges JL, Diamant J, Guimaraes JI, Nicolau JC, dos Santos JE, de Lima JJ, Vieira JL, Novazzi JP, Faria Neto JR, Torres KP, Pinto Lde A, Bricarello L, Bodanese LC, Introcaso L, Malachias MV, Izar MC, Magalhaes ME, Schmidt MI, Scartezini M, Nobre M, Foppa M, Forti NA, Berwanger O, Gebara OC, Coelho OR, Maranhao RC, dos Santos Filho RD, Costa RP, Barreto S, Kaiser S, Ihara S, Carvalho T, Martinez TL, Relvas WG & Salgado W (2007) [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras Cardiol* **88 Suppl 1**, 2-19.
- Stein AD, Rundle A, Wada N, Goldbohm RA & Lumey LH (2009) Associations of gestational exposure to famine with energy balance and macronutrient density of the diet at age 58 years differ according to the reference population used. *J Nutr* **139**, 1555-1561.
- Stewart CP, Christian P, Schulze KJ, Leclercq SC, West KP, Jr. & Khattry SK (2009) Antenatal micronutrient supplementation reduces metabolic syndrome in 6- to 8-year-old children in rural Nepal. *J Nutr* **139**, 1575-1581.
- Straznický NE, Eikelis N, Lambert EA & Esler MD (2008) Mediators of sympathetic activation in metabolic syndrome obesity. *Curr Hypertens Rep* **10**, 440-447.
- Sun CW, Falck JR, Harder DR & Roman RJ (1999) Role of tyrosine kinase and PKC in the vasoconstrictor response to 20-HETE in renal arterioles. *Hypertension* **33**, 414-418.
- Sutin AR, Costa PT, Jr., Uda M, Ferrucci L, Schlessinger D & Terracciano A (2010) Personality and metabolic syndrome. *Age (Dordr)* **32**, 513-519.
- Szathmari M, Vasarhelyi B, Szabo M, Szabo A, Reusz GS & Tulassay T (2000) Higher osteocalcin levels and cross-links excretion in young men born with low birth weight. *Calcif Tissue Int* **67**, 429-433.
- Taal HR, Vd Heijden AJ, Steegers EA, Hofman A & Jaddoe VW (2012) Small and large size for gestational age at birth, infant growth, and childhood overweight. *Obesity (Silver Spring)*.
- Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI & Moran TH (2009) Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* **58**, 1116-1125.
- Tanaka S, Yagi Y, Yamazaki T, Mitsumoto A, Kobayashi D, Kudo N & Kawashima Y (2012) Characterization of fatty acid profile in the liver of SHR/NDmcr-cp (cp/cp) rats, a model of the metabolic syndrome. *Biol Pharm Bull* **35**, 184-191.
- Thompson C, Syddall H, Rodin I, Osmond C & Barker DJ (2001) Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *Br J Psychiatry* **179**, 450-455.
- Trumbo P, Schlicker S, Yates AA & Poos M (2002) Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc* **102**, 1621-1630.

- Tu WC, Muhlhausler BS, Yelland LN & Gibson RA (2013) Correlations between blood and tissue omega-3 LCPUFA status following dietary ALA intervention in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **88**, 53-60.
- Uddin MR, Muthalif MM, Karzoun NA, Benter IF & Malik KU (1998) Cytochrome P-450 metabolites mediate norepinephrine-induced mitogenic signaling. *Hypertension* **31**, 242-247.
- UEC & NEPA. (2011) *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO / NEPA-UNICAMP*. Campinas-SP.
- USDA (2012) National Nutrient Database for Standard Reference. In *Release 25* [USDo Agriculture, editor: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>].
- Vaidya A, Saville N, Shrestha BP, Costello AM, Manandhar DS & Osrin D (2008) Effects of antenatal multiple micronutrient supplementation on children's weight and size at 2 years of age in Nepal: follow-up of a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **371**, 492-499.
- Valenzuela A & Nieto S (2003) Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev Chil Pediatr* **74**, 149-157.
- van Eijsden M, Hornstra G, van der Wal MF, Vrijkotte TG & Bonnel GJ (2008) Maternal n-3, n-6, and trans fatty acid profile early in pregnancy and term birth weight: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* **87**, 887-895.
- van Eijsden M, Vrijkotte T, Gemke R & van der Wal M (2011) Cohort profile: the Amsterdam Born Children and their Development (ABCD) study. *Int J Epidemiol* **40**, 1176-1186.
- Vanitallie TB (2002) Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism* **51**, 40-45.
- Vessby B, Tengblad S & Lithell H (1994) Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men. *Diabetologia* **37**, 1044-1050.
- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL & Gluckman PD (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E83-87.
- von Schacky C, Fischer S & Weber PC (1985) Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Invest* **76**, 1626-1631.
- Vrijheid M, Casas M, Bergstrom A, Carmichael A, Cordier S, Eggesbo M, Eller E, Fantini MP, Fernandez MF, Fernandez-Somoano A, Gehring U, Grazuleviciene R, Hohmann C, Karvonen AM, Keil T, Kogevinas M, Koppen G, Kramer U, Kuehni CE, Magnus P, Majewska R, Andersen AM, Patelarou E, Petersen MS, Pierik FH, Polanska K, Porta D, Richiardi L, Santos AC, Slama R, Sram RJ, Thijs C, Tischer C, Toft G, Trnovec T, Vandentorren S, Vrijkotte TG, Wilhelm M, Wright J & Nieuwenhuijsen M (2012) European birth cohorts for environmental health research. *Environ Health Perspect* **120**, 29-37.
- Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS & Eckfeldt JH (2003) Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* **78**, 91-98.
- Wang Q, Bing C, Al-Barazanji K, Mossakowaska DE, Wang XM, McBay DL, Neville WA, Taddayon M, Pickavance L, Dryden S, Thomas ME, McHale MT, Gloyer IS, Wilson S, Buckingham R, Arch JR, Trayhurn P & Williams G (1997) Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* **46**, 335-341.
- Warensjo E, Riserus U & Vessby B (2005) Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia* **48**, 1999-2005.
- Wild CP (2005) Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1847-1850.

- Wree A, Kahraman A, Gerken G & Canbay A (2011) Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* **83**, 124-133.
- Yabaluri N & Bashyam MD (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* **35**, 473-484.
- Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, Bhat DS, Naik SS, Coyaji KJ, Joglekar CV, Joshi N, Lubree HG, Deshpande VU, Rege SS & Fall CH (2008) Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* **51**, 29-38.
- Yoo SB, Ryu V, Park EY, Kim BT, Kang DW, Lee JH & Jahng JW (2011) The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* **45**, 343-349.
- Youdim KA, Martin A & Joseph JA (2000) Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* **18**, 383-399.
- Zhou L, Sutton GM, Rochford JJ, Semple RK, Lam DD, Oksanen LJ, Thornton-Jones ZD, Clifton PG, Yueh CY, Evans ML, McCrimmon RJ, Elmquist JK, Butler AA & Heisler LK (2007) Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signaling pathways. *Cell Metab* **6**, 398-405.
- Zulkifli SN & Yu SM (1992) The food frequency method for dietary assessment. *J Am Diet Assoc* **92**, 681-685.