

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**A MANIPULAÇÃO DURANTE O PERÍODO  
NEONATAL ALTERA A PREFERÊNCIA ALIMENTAR  
E O PERFIL METABÓLICO DE RATOS NA VIDA  
ADULTA**

CARLA DA SILVA BENETTI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**A MANIPULAÇÃO DURANTE O PERÍODO  
NEONATAL ALTERA A PREFERÊNCIA ALIMENTAR  
E O PERFIL METABÓLICO DE RATOS NA VIDA  
ADULTA**

CARLA DA SILVA BENETTI

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zubaran Goldani**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Dalmaz**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil, 2007

222

**B465m** Benetti, Carla da Silva

A manipulação durante o período neonatal altera a preferência alimentar e o perfil metabólico de ratos na vida adulta / Carla da Silva Benetti ; orient. Marcelo Zubaran Goldani ; co-orient. Carla Dalmaz. – 2007.

72 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Preferências alimentares 2. Animais recém-nascidos 3. Modelos animais de doenças 4. Metabolismo 5. Ratos I. Goldani, Marcelo Zubaran II. Dalmaz, Carla III. Título.

NLM: QT 235

## AGRADECIMENTOS

Ao Marcelo, meu orientador, pela confiança, apoio, pela imensa motivação e paciência, assim como pelos ensinamentos, oportunidades, pelo exemplo de profissionalismo e pelo afeto, desde o princípio desta minha trajetória.

À Carla, minha co-orientadora, pelo acolhimento no laboratório 11, pela delicadeza, sensibilidade e carinho, pela atenção e disponibilidade, sempre vibrando a cada novo achado e incentivando novas idéias. Agradeço também pelo aprendizado e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório 11 pela receptividade, colaboração, companheirismo, alegria e amizade.

Aos meus pais, Sílvia e Carlos, e à minha irmã, Cátia, pelo amor, carinho, pela compreensão nos momentos de estresse e pelo apoio na superação das dificuldades.

Ao Roger, pelo amor, estímulo, companheirismo e atenção, e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Aos queridos amigos Patrícia e André que foram fundamentais para a minha inserção no laboratório 11, sempre depositando confiança e motivação sobre todas as idéias propostas, incentivando a superar obstáculos, criando oportunidades, e compondo uma excelente parceria de trabalho e um forte laço de amizade.

À professora Sandra Machado, pela injeção de estímulo, disponibilidade para discutir idéias, pelo apoio, confiança e carinho.

À Universidade (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação (PPGCM: Pediatria) pela oportunidade.

Ao CNPq por viabilizar este trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 EVENTOS PRECOSES E ALTERAÇÃO DO PADRÃO SAÚDE-DOENÇA NA VIDA ADULTA .....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 INTERAÇÃO MATERNO-INFANTIL .....</b>	<b>02</b>
<b>1.3 ESTRESSE NEONATAL .....</b>	<b>03</b>
<b>1.4 EXPOSIÇÃO A GLICOCORTICÓIDES E PREFERÊNCIA ALIMENTAR .....</b>	<b>04</b>
<b>1.5 COMPORTAMENTO ALIMENTAR E ALTERAÇÕES METABÓLICAS .....</b>	<b>07</b>
<b>1.6 SÍNDROME METABÓLICA .....</b>	<b>08</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>10</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3 MODELO DE MANIPULAÇÃO NEONATAL.....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 HABITUAÇÃO AO ALIMENTO NOVO .....</b>	<b>14</b>
<b>4.5 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ALIMENTO PALATÁVEL NA CAIXA-MORADIA ....</b>	<b>15</b>
<b>.....</b>	<b>15</b>
<b>4.6 COLETA DE SANGUE E DISSECÇÃO DA GORDURA ABDOMINAL .....</b>	<b>15</b>
<b>4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>16</b>
<b>4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS (ARTIGO).....</b>	<b>17</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>

<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

GCs: Glicocorticóides

HDL: High-density lipoprotein

HPA: Hipotálamo-pituitária-adrenal

RNA: Ácido ribonucléico

SNC: Sistema nervoso central

## RESUMO

Estudos prévios demonstraram que ratos manipulados no período neonatal apresentavam um maior consumo de alimento doce na vida adulta, em comparação com ratos não manipulados, quando esse alimento lhes é oferecido durante curtos períodos de tempo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da manipulação neonatal sobre o padrão metabólico de animais adultos expostos cronicamente a uma dieta hipercalórica e palatável (chocolate). Desta forma, foram medidos o consumo de alimentos (ração padrão e chocolate), ganho de peso corporal, depósito de gordura abdominal, peso das glândulas adrenais e parâmetros bioquímicos como lipídios, glicose, insulina, e corticosterona plasmáticos em ratos adultos que foram expostos ou não à manipulação neonatal (10 min/dia, nos 10 primeiros dias de vida). Ratos que foram manipulados no período neonatal apresentaram uma ingestão de chocolate aumentada, porém este consumo diminuiu com o passar do tempo, atingindo níveis semelhantes aos dos animais não manipulados. Ratos machos manipulados apresentaram maior peso corporal, assim como maior eficiência calórica e níveis de triglicerídeos diminuídos no plasma, independentemente da dieta, enquanto que ratas fêmeas não manipuladas que receberam chocolate apresentaram depósito de gordura abdominal aumentado. Também foi observado, nas ratas fêmeas, maior depósito de gordura abdominal, níveis mais elevados de colesterol total e de glicose, bem como níveis mais baixos de insulina, quando comparadas com ratos machos. O consumo de chocolate reduziu o peso das glândulas adrenais tanto nos animais manipulados quanto nos controles. Assim, esses achados sugerem que a manipulação neonatal induz um padrão metabólico particular, o qual parece proteger os animais dos efeitos deletérios de uma dieta hiperpalatável e hipercalórica, e ainda, a manipulação parece afetar diferentemente ratos machos e fêmeas.

**PALAVRAS CHAVE:** manipulação neonatal, estresse neonatal, dieta palatável, padrão metabólico.



## **SUMMARY**

Previous studies have already observed that neonatal handled rats consume more sweet food compared to non-handled ones in adult life, when this type of food is offered during short intervals of time. The aim, in this study, was to assess the effects of neonatal handling on the metabolic pattern of adult rats chronically exposed to a palatable diet (chocolate). We measured the consumption of foods (standard lab chow and chocolate), body weight gain, abdominal fat deposition, adrenal glands' weight and biochemical measures such as plasma lipids, glucose, insulin, and corticosterone in adult rats which had been exposed or not to neonatal handling (10 min/day, 10 first days of life). An increased intake of chocolate in handled rats was found, but this consumption decreases as the days passed by, reaching the same levels as non-handled animals. Handled male animals presented higher body weight, higher caloric efficiency and lower plasma triglycerides levels, independently of the diet, while non-handled female rats receiving chocolate presented increased abdominal fat deposition. Female rats also presented increased abdominal fat deposition, higher total cholesterol and glucose levels as well as lower insulin in comparison to males. Interestingly, chocolate consumption diminished adrenal glands' weight in both groups. These findings suggest that neonatal handling induces a particular metabolic pattern, which seems to protect the animals against deleterious effects of a highly palatable, highly caloric diet, and also it seems to differentially affect females and males.

**KEY WORDS:** neonatal handling, neonatal stress, palatable diet, metabolic pattern.

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 EVENTOS PRECOSES E ALTERAÇÃO DO PADRÃO SAÚDE-DOENÇA NA VIDA ADULTA**

Desde a década de 70, estudos avaliando crescimento e desenvolvimento infantil vêm despertando o interesse de pesquisadores, na busca de uma melhor compreensão do impacto de um evento precoce sobre a morbidade mais tarde na vida, assim como dos mecanismos envolvidos nessa relação causal.

Durante a vida fetal, órgãos e tecidos do corpo passam pelo chamado período crítico do desenvolvimento (WIDDOWSON, MCCANCE, 1975). Assim, um estímulo ou insulto manifestado neste período pode prejudicar a função de uma estrutura ou ajustar um sistema fisiológico (BARKER et al., 1993; LUCAS, 1994; SINGHAL, LUCAS, 2004), e os efeitos de um insulto precoce podem ser observados ao longo de toda a vida (LUCAS, 1991; BENEDIKTSSON et al., 1993). Dessa forma surge, então, o conceito de “programação”, a qual é definida como o resultado da evolução das respostas adaptativas, pelas quais o feto altera sua fisiologia e estrutura, na expectativa de um ambiente futuro que ele encontrará após o nascimento (BARKER, 1998; GLUCKMAN, HANSON, 2004).

Eventos ocorridos durante um período precoce do desenvolvimento programam alterações nos parâmetros metabólico, fisiológico e estrutural (BARKER, 1995), e esses efeitos produzidos apresentam-se de forma profunda e permanente na vida adulta, podendo, ainda, afetar gerações seguintes (METCALFE, MONAGHAN, 2001).

Estudos realizados em humanos demonstram que eventos ocorridos durante a vida fetal estão associados com a ocorrência de diabetes do tipo II (FORSEN et al., 2000), diminuída sensibilidade à insulina (SOTO, MERICQ, 2005) e maior vulnerabilidade para o desenvolvimento de obesidade abdominal (LAITINEN et al., 2004).

Outros autores abordam a influência de um ambiente uterino adverso sobre o aumento da pressão arterial (LAW et al., 2002), dos níveis séricos de colesterol (DAVIES et al., 2004), bem como do risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica (KANAKA-GANTENBEIN et al., 2003) e doença cardiovascular (ERIKSSON et al., 2001; SYDDALL et al., 2005) na vida adulta. De forma semelhante, estudos envolvendo animais demonstram que eventos precoces programam alterações no desenvolvimento endócrino-metabólico (LESAGE et al., 2001), assim como na fisiologia cardiovascular (O'REGAN et al., 2004) na vida adulta.

Adicionalmente, a literatura aborda que um crescimento acelerado em períodos cruciais do desenvolvimento pode ter importantes conseqüências adversas sobre a saúde, incluindo alterações metabólicas persistentes (FEWTRELL et al., 2000; PARSONS et al., 2001). Algumas evidências demonstram que indivíduos expostos a um ambiente uterino adverso e que, posteriormente, apresentam um padrão de crescimento compensatório nos primeiros anos de vida, têm um risco aumentado para o desenvolvimento de resistência à insulina (ERIKSSON et al., 2002), diabetes tipo II (FORSEN et al., 2000), hipertensão (BARKER et al., 2002), síndrome metabólica (FAGERBERG et al., 2004) e evento cardiovascular (REMACLE et al., 2004) mais tarde na vida.

Já que eventos precoces têm efeitos determinantes sobre o padrão de saúde-doença na vida adulta, dessa forma, caberia investigar a possibilidade desses eventos protegerem contra alterações desse padrão, quando animais adultos são desafiados com uma exposição crônica a uma dieta hipercalórica e hiperpalatável.

## **1.2 INTERAÇÃO MATERNO-INFANTIL**

A relação materno-infantil desempenha um papel determinante em diversos aspectos relacionados à saúde mental (NIEMI et al., 2004<sup>a,b</sup>), comportamento, incluindo comportamento alimentar (WRIGHT et al., 2006<sup>a</sup>, BURDETTE et al., 2006) e metabolismo (BURDETTE et al., 2006; WRIGHT et al., 2006<sup>b</sup>; FAITH et al., 2003). Em mamíferos, a mãe

representa o principal estímulo ambiental, assim como o mais importante provedor para o seu descendente, de forma que determinadas variáveis associadas com a mãe correlacionam-se com desfechos observados na criança mais tarde na vida (SAVINO et al., 2006). Além disso, o cuidado materno exerce um efeito profundo, persistente, o qual pode, ainda, estender-se entre gerações em animais (ZHANG et al., 2006; CHAMPAGNE et al., 2001) e humanos (PRUESSNER et al., 2004).

Estudos experimentais abordando comportamento materno demonstram que filhotes de mães mais cuidadoras, apresentam reduzida resposta a um estresse agudo quando adultos, em razão da aumentada expressão de RNA mensageiro para receptores de glicocorticóides no hipocampo (LIU et al., 1997), o que aumenta a retroalimentação negativa. Adicionalmente, esses animais apresentam menor medo, maior exploração quando expostos a um ambiente novo e menor latência para consumir um novo alimento (FRANCIS et al., 1999; CALDJI et al., 1998). Dessa forma, o cuidado materno durante a infância parece ter um papel fundamental na programação das respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse na vida adulta (CAMERON et al., 2005; LIU et al., 1997; CIRULLI et al., 2003).

Considerando a importância do cuidado materno no início da vida e suas implicações subsequentes, tem se observado um crescente incentivo à prática do contato precoce materno-infantil nas maternidades, através da criação de Programas de Saúde Pública direcionados para os benefícios gerados por essa interação. Efeitos do contato materno-infantil têm sido demonstrados sobre a modulação do sistema motor do recém-nascido (FERBER, MAKHOUL, 2004), desenvolvimento cognitivo e neurológico (CHARPAK et al., 2005; FELDMAN, EIDELMAN, 2003), além de prepará-lo para o enfrentamento do ambiente extra-uterino e seus estímulos.

### **1.3 ESTRESSE NEONATAL**

Hans Selye, pioneiro na pesquisa sobre efeitos biológicos da exposição a um estímulo estressor, introduziu o conceito de estresse em 1936. Conforme este pesquisador, “estresse” é

definido como uma resposta do organismo a um estressor, sendo o objetivo da resposta ao estresse manter a estabilidade do sistema fisiológico, ou seja, a homeostase. Tal resposta envolve a liberação de epinefrina pela medula adrenal e de glicocorticóides (GCs) pelo córtex da adrenal. Segundo Goldstein and McEwen (2002), “estresse” refere-se à resposta causada por uma sucessão de eventos que desafia a homeostase.

Define-se “estressor” como um desafio ao indivíduo, que perturba a homeostase e requer uma resposta adaptativa ou, ainda, que pode ser interpretado equivocadamente como ameaça e resultar em uma resposta comportamental ou hormonal (MCEWEN, 2002).

O período neonatal de um rato, constituído pelas duas primeiras semanas de vida, corresponde ao período perinatal em humanos. Neste período, o desenvolvimento de várias estruturas e sistemas, como o sistema nervoso central (SNC), ainda se faz presente. Denominado de período hiporresponsivo ao estresse (SAPOLSKY, MEANEY, 1986), os primeiros 15 dias após o nascimento são caracterizados por uma fase de diminuída resposta adrenocortical ao estímulo estressor, na qual é observada uma realçada sensibilidade à retroalimentação negativa dos glicocorticóides na hipófise (WALKER et al., 1986) e diminuída responsividade ao ACTH na adrenal (YOSHIMURA et al., 2003).

Sendo este período na vida do rato um período crítico do desenvolvimento, a submissão precoce a um estressor determina alterações neuroquímicas e comportamentais identificáveis ao longo da vida. Além disso, outras experiências precoces, tais como a relação mãe-filhote, interagem com fatores endógenos para determinar a resposta do organismo a um estímulo estressor durante a vida adulta (PANAGIOTAROPOULOS et al., 2004). Dessa forma, algumas abordagens experimentais foram desenvolvidas para estudar a relevante interação mãe-filhote, assim como os efeitos de intervenções precoces sobre o comportamento na vida adulta. Dentre elas está a manipulação neonatal, que será enfatizada neste trabalho.

O modelo de manipulação (LEVINE et al., 1967) é caracterizado por uma breve, repetida e aparentemente inócua separação da mãe durante o período neonatal. Este protocolo é conhecido por produzir um aumento no cuidado materno (BRANCHI et al., 2001; PRYCE et al., 2001), e tal comportamento é observado no momento em que os filhotes retornam para a caixa-moradia, após um curto período de separação.

Na vida adulta, animais submetidos à manipulação no período neonatal demonstram menor medo, maior atividade e exploração quando expostos a um ambiente novo (LEVINE et al., 1967) e a uma situação de perigo potencial, como quando exploram um ambiente desconhecido na presença de um predador (PADOIN et al., 2001); esses animais também apresentam diminuída reatividade ao estresse (LEVINE et al., 1967, ADER, GROTA, 1969; PADOIN et al., 2001, PANAGIOTAROPOULOS et al., 2004), maior concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo, que está relacionada com a exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos GCs (MEANEY et al., 1989; ADER, GROTA, 1969), diminuição do padrão reprodutivo (PADOIN et al., 2001; GOMES et al., 2005) e aumento no consumo de alimentos palatáveis (SILVEIRA et al., 2004).

A exposição crônica aos glicocorticóides está associada com a ocorrência de doenças metabólicas tais como obesidade, hipertensão, hiperglicemia e alterações nos lipídios sanguíneos, características clássicas da síndrome metabólica (BOULLU-CIOCCA et al., 2005; BRUNNER et al., 2002; DUCLOS et al., 2005). Uma vez que os animais manipulados apresentam diferente reatividade ao estresse, estando expostos a níveis mais baixos de GCs, poderiam apresentar uma menor predisposição para essas doenças de origem metabólica, pois esses animais seriam menos suscetíveis aos efeitos prejudiciais decorrentes da exposição a elevados níveis de GCs.

#### **1.4 EXPOSIÇÃO A GLICOCORTICÓIDES E PREFERÊNCIA ALIMENTAR**

Aguda ou cronicamente, a exposição aos glicocorticóides ou a certos modelos de estresse crônico está relacionada com um aumento no consumo de alimentos palatáveis em ratos adultos (ELY et al., 1997; PECORARO et al., 2004; SILVEIRA et al., 2004), talvez relacionado com uma alteração do estado de ansiedade destes animais (ELY et al., 1997). O consumo de alimentos palatáveis reduz a resposta do eixo HPA, sendo uma resposta adaptativa ao estresse (PECORARO et al., 2004). Assim, os glicocorticóides agem

estimulando a ingestão de alimentos com elevado valor energético e alterando os estoques de gordura abdominal (PECORARO et al., 2005; DALLMAN et al., 2005). Da mesma forma, em humanos, elevados níveis de GCs após estresse aumentam o consumo de alimentos altamente calóricos e estão associados com o comportamento de comer compulsivo (EPEL et al., 2001; FREEMAN, GIL, 2004). Alterações na atividade do eixo HPA estão relacionadas com distúrbios alimentares como bulimia e anorexia nervosa (FICHTER et al., 1990; KAYE et al., 1988).

A atividade do eixo HPA também pode ser influenciada pelo tipo de alimento consumido. Uma dieta hipercalórica, rica em alimento doce e gordura, provoca uma redução na resposta do eixo ao estresse (PECORARO et al., 2004), sugerindo um efeito metabólico-periférico da dieta sobre o cérebro (DALLMAN et al., 2003). Entretanto, uma dieta contendo alto teor de gordura realça os níveis de glicocorticóides basal e induzido por estresse, possivelmente agindo como um fator estressor (TANNENBAUM et al., 1997; KAMARA et al., 1998).

Animais submetidos a estresse no período neonatal, quando se utiliza a simples manipulação do animal durante um curto período de tempo (10 minutos) também apresentam, quando adultos, alterações na preferência alimentar (SILVEIRA et al., 2004). Assim, além de apresentarem uma atividade diferencial do eixo HPA (LEVINE et al., 1967), esses animais também mostram alteração no comportamento alimentar, aumentando o consumo de doce quando este é oferecido durante breves períodos (3 minutos) em um outro ambiente fora da caixa-moradia, por 6 dias consecutivos. Esse efeito é observado com o animal submetido à restrição alimentar e também com o animal alimentado *ad libitum* (SILVEIRA et al., 2004). O fato do animal ser exposto ao alimento doce de forma aguda influencia o seu comportamento frente a este alimento, já que existe um maior interesse pela novidade, o qual é refletido no alterado consumo do alimento palatável. No entanto, não está ainda determinado se esses animais manipulados no período neonatal também apresentariam aumento do consumo se houvesse uma oferta crônica de alimentos palatáveis.

## 1.5 COMPORTAMENTO ALIMENTAR E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

A dieta pode afetar a saúde do organismo. Por exemplo, sabe-se que a ingestão excessiva de alguns nutrientes da dieta está relacionada com maior risco para determinadas doenças, como hipertensão e diabetes (GROSS et al. 2004, KROUSEL-WOOD et al., 2004). Foi estabelecido que o consumo de ácidos graxos trans e de carboidratos simples está associado com aumentado risco para doença coronariana (DYERBERG et al., 2004; LIU et al., 2000<sup>a</sup>). O consumo de alimentos com alto índice glicêmico também contribui para um aumento no risco de doença cardiovascular (BELL, SEARS, 2003) e alguns tipos de câncer (TAVANI et al., 2006).

O fato de que diferentes dietas podem afetar a saúde também é observado quando se considera um maior consumo de frutas e vegetais, combinado com um consumo reduzido de gordura saturada, situação que produz efeito protetor contra a mortalidade por doença coronariana (TUCKER et al., 2005). Outros trabalhos demonstram que somente uma maior ingestão de frutas e vegetais reduz o risco de doença cardiovascular (LIU et al., 2000<sup>b</sup>). Além disso, uma diminuição no consumo de carboidratos, principalmente complexos, melhora os parâmetros sanguíneos característicos da síndrome metabólica (SHARMAN et al., 2004).

Os hábitos alimentares são estabelecidos no início da vida. Sabe-se que a alimentação na infância é um fator determinante da dieta na vida adulta e desempenha um importante papel na prevenção de doenças (MIKKILA et al., 2004). Escolhas dietéticas saudáveis na infância, como uma dieta rica em vegetais, estão associadas com uma alimentação saudável mais tarde na vida (MAYNARD et al., 2005) e com menor risco de evento cardiovascular (NESS et al., 2005). Assim sendo, intervenções no início da infância capazes de levar a alterações na preferência alimentar mais tarde na vida devem ser consideradas como potenciais fatores modificadores da dieta do organismo, e o conhecimento de seus efeitos e mecanismos nos permitirá ações preventivas e, quando necessário, um tratamento adequado para esses indivíduos.



## 1.6 SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica caracteriza-se por um conjunto de anormalidades metabólicas sendo definida pela presença de pelo menos 3 dos seguintes componentes:

<b>NCEP ATP III</b>	
<b>Glicemia de jejum</b>	≥ 110 mg/dl
<b>Circunferência cintura</b>	≥ 102 cm (homens), ≥ 88 cm (mulheres)
<b>Triglicerídeos</b>	≥ 150 mg/dl
<b>HDL - colesterol</b>	< 40 mg/dl (homens), < 50 mg/dl (mulheres)
<b>Hipertensão</b>	≥ 130/ ≥ 85 mmHg

NCEP ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III - 2001.

Uma série de distúrbios metabólicos freqüentemente observados em pacientes com resistência à insulina e diabetes do tipo 2 estão individualmente associados com risco aumentado para doença coronariana (LARSEN et al., 2003). Desta forma, a síndrome metabólica está relacionada com o desenvolvimento de diabetes melito do tipo 2 e doença cardiovascular (GROSS et al., 2004; MEERARANI et al., 2006). Por sua vez, o diabetes do tipo 2 tem sido associado com aumentado risco para morbi-mortalidade cardiovascular, independentemente de outros fatores de risco (LARSEN et al., 2003; SMIT, ROMIJN, 2006).

Algumas abordagens têm demonstrado associação entre hiperinsulinemia, importante componente da síndrome metabólica (LAMOUNIER-ZEPTER et al., 2006; LARSEN et al., 2003), e aumento no risco para doença coronariana (HANLEY et al., 2002; DESPRES et al., 1996). A resistência à insulina pode causar disfunção endotelial vascular, provocada por um desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores endoteliais, e hipertensão (POTENZA et al., 2005). Além disso, esta disfunção pode determinar o desenvolvimento de aterosclerose e como consequência, aumentar o risco de evento cardiovascular (HSUEH, QUINONES, 2003).

Alterações nas concentrações de lipídios plasmáticos também estão relacionadas com maior risco cardiovascular, visto que níveis elevados de triglicerídios e diminuídos de HDL contribuem para um estado pró-inflamatório, promovendo a formação de placas ateroscleróticas e aumentando o risco de evento cardiovascular (MEERARANI et al., 2006). Aumentos observados no índice colesterol total/HDL-c estão relacionados com a síndrome metabólica e, conseqüentemente, com elevado risco cardiovascular (REAL et al., 2006).

Foi demonstrado que o acúmulo de gordura abdominal está independentemente associado com síndrome metabólica (CARR et al., 2004; SALMENNIEMI et al., 2004), e risco aumentado para diabetes do tipo 2 e doença coronariana (DESPRES, 2006). Além disso, o aumento da gordura abdominal está relacionado com diminuída sensibilidade à insulina, sendo um importante determinante desta sensibilidade e função das células-beta pancreáticas (UTZSCHNEIDER et al., 2004).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Eventos precoces ocorridos na fase de desenvolvimento e crescimento somático podem influenciar o padrão de saúde e doença na idade adulta. Há fortes evidências associando a ocorrência de experiências estressantes precoces com desempenho metabólico precário em indivíduos adultos. Neste caso temos como exemplo, a associação da restrição de crescimento intra-uterino com a obesidade e a hipercolesterolemia no adulto. Contudo, não há na literatura evidências sobre intervenções precoces que confirmem proteção contra desfechos metabólicos inadequados. Portanto, este trabalho se propõe a estudar esta lacuna avaliando a influência de uma possível intervenção protetora para alterações metabólicas em animais submetidos a um evento nutricional de risco.

### **3 OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da manipulação neonatal sobre o padrão metabólico de animais adultos expostos cronicamente a uma dieta hipercalórica e palatável (chocolate). Assim, foi avaliado o consumo de alimentos, peso corporal e depósito de gordura abdominal bem como níveis plasmáticos de glicose, insulina, lipídios e corticosterona. A hipótese do presente trabalho era de que a manipulação neonatal esteja associada com um padrão diferencial de alimentação e ganho de peso e, possivelmente, com uma particular adaptação metabólica a este tipo de dieta.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

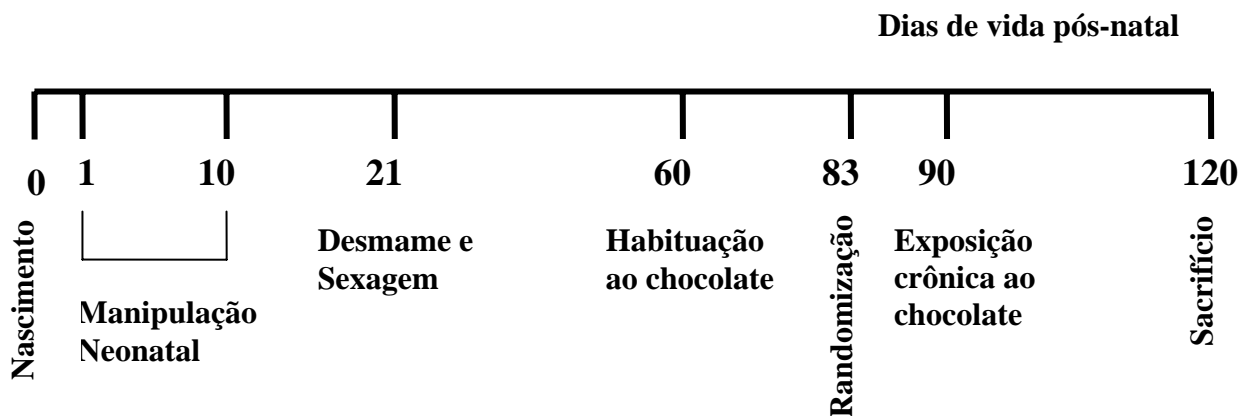
### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratas Wistar prenhes provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil), foram randomicamente selecionadas. As ratas permaneceram, individualmente, em caixas-moradia, confeccionadas em *Plexiglas* medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de maravalha, e foram mantidas em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , limpeza das caixas uma vez por semana, água e ração padrão *ad libitum*. Todas as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes nas primeiras 24hs após o nascimento e mantidas intactas, exceto para os procedimentos de manipulação que foram realizados entre às 09:00hs e às 11:00hs.

Mais de uma ninhada foi submetida ao procedimento de manipulação no mesmo dia; assim, neste período de 2 horas de procedimento estava incluído o tempo para: instalar a incubadora, trazer as caixas-moradia do biotério para a sala de experimentos, habituar brevemente as genitoras à nova sala, remover cuidadosamente os filhotes da ninhada, fazer a manipulação em si, e em seguida, retornar os filhotes para a mãe e, novamente após um breve período, retornar a caixa-moradia para o biotério. O pesquisador tinha o cuidado de trocar as luvas entre a manipulação de cada ninhada, para evitar a dispersão de qualquer tipo de odor de uma ninhada para outra.

O dia do nascimento foi considerado o dia 0 (zero). As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no dia 21 pós-natal. Foram utilizados no máximo dois filhotes do mesmo sexo e da mesma ninhada para o mesmo grupo. Após o desmame, os animais foram mantidos em torno de quatro a cinco por caixa. Os animais tinham livre acesso à ração padrão e água, exceto durante o período de exposição à dieta palatável quando grupos específicos também receberam chocolate na caixa-moradia.

A linha do tempo esquematizada abaixo demonstra a ordem em que os procedimentos experimentais foram realizados, nos diferentes momentos da vida dos animais:



## 4.2 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

O número de animais utilizados foi estimado a partir de experimentos prévios (SILVEIRA et al., 2004, 2006), nos quais ratos manipulados no período neonatal consomem aproximadamente 60% mais alimento palatável que ratos controles. Considerando o desvio-padrão de 0,6 gramas proveniente desses estudos, adotando um nível de significância de 5% e um poder de 80%, foi determinado o número de caixas necessárias para avaliar o consumo. Para as outras variáveis, foi estabelecida uma possível diferença de 20% entre os grupos, estimando um desvio-padrão semelhante ao observado previamente (SILVEIRA et al., 2006), adotando novamente um nível de significância de 5% e um poder de 80%. Assim, um total de 83 animais foi utilizado em diferentes experimentos, derivados de 25 ninhadas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

### 4.3 MODELO DE MANIPULAÇÃO NEONATAL

Grupo não-manipulado: Filhotes permaneceram com a mãe, sem manipulação neonatal, até o desmame. A limpeza rotineira das caixas foi interrompida durante esse período.

Grupo manipulado: Este procedimento foi realizado conforme anteriormente descrito (SILVEIRA et al., 2004). A mãe foi gentilmente afastada para um lado da caixa-moradia e os filhotes foram removidos do ninho e colocados dentro de uma caixa limpa forrada com papel toalha. Então, a ninhada foi colocada em uma incubadora ajustada para manter uma temperatura ambiente de 30-32°C (temperatura da água de 34° C), enquanto a genitora foi mantida na caixa-moradia posicionada ao lado da incubadora. Após 10 minutos, os filhotes retornaram para sua respectiva mãe. Este procedimento foi realizado do dia 1 ao dia 10 pós-natal, em seguida, os filhotes foram mantidos com a mãe, sem manipulação, até o dia 21 pós-natal.

### 4.4 HABITUAÇÃO AO ALIMENTO NOVO

A partir do dia 60 de vida, os ratos foram habituados a um novo ambiente contendo um alimento novo. Neste experimento, os animais foram colocados em uma caixa retangular medindo 40 x 15 x 20 cm, com partes inferior e laterais revestidas em madeira e parte superior em vidro transparente. Uma porção de chocolate pesada previamente (chocolate ao leite – Neugebauer®) foi colocada em uma das extremidades da caixa-corredor. Os animais foram habituados a esse ambiente por 5 dias, durante 3 minutos cada dia, sob restrição alimentar (recebendo em torno de 80% do consumo habitual). No 6º dia, os ratos foram testados para o consumo de alimento palatável, após terem recebido ração padrão *ad libitum* nas 24 horas prévias. Esses procedimentos foram realizados para verificar se os animais comeriam chocolate da mesma forma que eles comumente ingerem outros tipos de alimentos palatáveis (SILVEIRA et al., 2004), com e sem restrição alimentar. Após esse período de

habituação, os animais receberam ração padrão *ad libitum*. Todos os procedimentos seguintes foram realizados com os animais em estado alimentado.

#### **4.5 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ALIMENTO PALATÁVEL NA CAIXA-MORADIA**

No 83º dia de vida, todos os animais foram pesados e randomizados em diferentes grupos do mesmo sexo, sendo colocados em números de 3 a 4 por caixa. Os grupos foram subdivididos em 1) Não-manipulado + ração padrão, 2) Não-manipulado + chocolate + ração padrão, 3) Manipulado + ração padrão e 4) Manipulado + chocolate + ração padrão. Uma semana depois, grupos específicos começaram a receber chocolate *ad libitum* na caixa-moradia. Durante 30 dias, porções previamente pesadas de chocolate e de ração padrão foram oferecidas, e a quantidade restante foi medida diariamente para avaliar o consumo. Os animais foram pesados uma vez por semana ao longo do período de exposição à dieta. Passados 30 dias de exposição à dieta palatável, os ratos foram sacrificados por decapitação após 6 horas de jejum. O consumo de alimentos foi medido por caixa e então dividido pelo número de animais em cada caixa para determinar o consumo médio por animal. Na análise estatística do consumo de alimentos, n representa o número de caixas. A Tabela 1 (ver artigo) descreve a composição nutricional das dietas usadas no estudo.

#### **4.6 COLETA DE SANGUE E DISSECÇÃO DA GORDURA ABDOMINAL**

O sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados para determinação de insulina, glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídios e corticosterona. Os tubos foram centrifugados a 4°C e o plasma foi separado e congelado a - 20°C até o dia das análises.



As glândulas adrenais foram cuidadosamente dissecadas e pesadas. As duas maiores porções da gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas e pesadas separadamente. Tanto as glândulas adrenais quanto os depósitos de gordura abdominal foram pesados utilizando uma balança com precisão de 0,0001g.

#### **4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

O plasma foi extraído com acetato de etila, e o extrato evaporado e dissolvido para avaliação da corticosterona utilizando um kit ELISA (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA). Os níveis de insulina plasmática também foram mensurados utilizando ELISA (Alpco Diagnostics, Merckodia AB, Uppsala, Suécia). A glicemia foi medida pelo método de glicose-oxidase (BioSystems, Barcelona, Espanha). Os níveis de colesterol total e de triglicerídios foram medidos com kits comerciais (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). O HDL-colesterol foi mensurado usando um kit proveniente do laboratório Wiener, Rosário, Argentina.

#### **4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de duas vias, três vias, ou por ANOVA de medidas repetidas, seguidas pelo teste post-hoc de Duncan, quando indicado. O nível de significância estabelecido foi de 5%. O tamanho amostral foi calculado como descrito acima.

## **RESULTADOS**

### **Artigo:**

**Could preference for palatable foods, in neonatally handled rats, alter metabolic pattern in adult life?** Artigo aceito para publicação na revista Pediatric Research.

**Artigo: A preferência por alimentos palatáveis, em ratos manipulados no período neonatal, altera os padrões metabólicos na vida adulta?****RESUMO**

Estudos prévios demonstram que ratos manipulados no período neonatal consomem mais alimento doce na vida adulta comparados com ratos não manipulados. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da manipulação neonatal sobre o padrão metabólico de ratos adultos expostos cronicamente a uma dieta hiperpalatável e hipercalórica (chocolate). Dessa forma, foram medidos o consumo de alimentos (ração padrão e chocolate), ganho de peso corporal, depósito de gordura abdominal bem como níveis de lipídios plasmáticos, glicemia, insulinemia, e corticosterona de ratos adultos manipulados (10 min/dia, nos 10 primeiros dias de vida) ou não manipulados no período neonatal. Animais manipulados apresentaram um consumo aumentado de chocolate, porém esse consumo diminuiu com o passar do tempo de exposição. Ratos machos manipulados exibiram maior peso corporal e maior eficiência calórica, além de níveis mais baixos de triglicerídios plasmáticos. Fêmeas não manipuladas, que foram expostas cronicamente à dieta hipercalórica, apresentaram depósito de gordura abdominal aumentado quando comparadas com fêmeas manipuladas. Ratas fêmeas demonstraram depósito de gordura abdominal aumentado, níveis mais elevados de colesterol total e glicose no plasma, assim como níveis mais baixos de insulina em comparação com ratos machos. O consumo de chocolate diminuiu o peso das glândulas adrenais tanto nos animais manipulados quanto nos controles. Assim, essas observações sugerem que a manipulação neonatal induz um padrão metabólico particular, e ainda, parece afetar diferentemente ratos machos e fêmeas.

**PALAVRAS CHAVE:** manipulação neonatal, estresse neonatal, dieta palatável, padrão metabólico.

**ABREVIACÕES:** HPA, eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

## INTRODUÇÃO

A interação materno-infantil tem uma importante influência sobre a programação do padrão comportamental (1,2) e metabólico (2,3) dos descendentes que pode persistir durante a vida adulta. Em mamíferos, a mãe é o principal estímulo ambiental e a fonte provedora para a criança, sabe-se também que o cuidado materno tem um efeito profundo, permanente, que pode estender-se entre gerações em animais (4,5) e humanos (6).

Algumas abordagens experimentais foram desenvolvidas para melhor estudar essa interação. Uma dessas abordagens é a manipulação neonatal, que caracteriza-se por uma breve, repetida e aparentemente inócua separação da mãe durante o período neonatal. A manipulação neonatal modula o desenvolvimento do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e está associada com diminuída reatividade ao estresse na vida adulta (7,8) e com maior consumo de alimentos palatáveis (9).

Os glicocorticóides estão envolvidos no desenvolvimento de distúrbios alimentares (10,11); eles também modulam a saliência para o consumo de um alimento palatável e influenciam a distribuição de gordura abdominal (12). Além disso, uma exposição crônica aos glicocorticóides está associada com características clássicas da síndrome metabólica (13,14,15). Visto que a manipulação neonatal leva a uma função diferencial do eixo HPA e também afeta o comportamento alimentar, possivelmente esses ratos poderiam exibir uma adaptação especial quando expostos a um desafio em específico, neste caso, a exposição crônica a uma dieta hiperpalatável.

Assim, o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos da manipulação neonatal sobre o padrão metabólico de ratos adultos expostos cronicamente a uma dieta hiperpalatável e hipercalórica (chocolate). Para isso o consumo de alimentos, peso corporal e depósito de gordura abdominal foram medidos. Níveis plasmáticos de glicose, insulina, lipídios e corticosterona também foram analisados. Nossa hipótese era de que a manipulação neonatal esteja associada com um padrão diferencial de alimentação e ganho de peso e, possivelmente, com uma particular adaptação metabólica a este tipo de dieta.

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### *Animais experimentais:*

Ratas Wistar prenhes provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil), foram randomicamente selecionadas. Em seguida, foram mantidas individualmente na caixa-moradia em um ambiente controlado, com água e ração padrão *ad libitum*. Todas as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes

nas primeiras 24hs após o nascimento e mantidas intactas, exceto para os procedimentos de manipulação que foram realizados entre às 09:00hs e às 11:00hs. O pesquisador tinha o cuidado de trocar as luvas entre a manipulação de cada ninhada, para evitar a dispersão de qualquer tipo de odor de uma ninhada para outra.

O dia do nascimento foi considerado o dia 0 (zero). As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no dia 21 pós-natal. Foram utilizados no máximo dois filhotes do mesmo sexo e da mesma ninhada para o mesmo grupo. Após o desmame, os animais foram mantidos em torno de quatro a cinco por caixa. Um total de 83 animais foi utilizado em diferentes experimentos, derivados de 25 ninhadas. O número de animais utilizados foi estimado a partir de experimentos prévios (9, 16), nos quais ratos manipulados no período neonatal consomem aproximadamente 60% mais alimento palatável que ratos controles. Considerando o desvio-padrão de 0,6 gramas proveniente desses estudos, adotando um nível de significância de 5% e um poder de 80%, foi determinado o número de caixas necessárias para avaliar o consumo. Para as outras variáveis, foi estabelecida uma possível diferença de 20% entre os grupos, estimando um desvio-padrão semelhante ao observado previamente (16), adotando novamente um nível de significância de 5% e um poder de 80%. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

#### *Modelo de Manipulação Neonatal:*

Grupo não-manipulado: Filhotes permaneceram com a mãe, sem manipulação neonatal, até o desmame. A limpeza rotineira das caixas foi interrompida durante esse período.

Grupo manipulado: Este procedimento foi realizado conforme anteriormente descrito (9). A mãe foi gentilmente afastada para um lado da caixa-moradia e os filhotes foram removidos do ninho e colocados dentro de uma caixa limpa forrada com papel toalha. Então, a ninhada foi colocada em uma incubadora ajustada para manter uma temperatura ambiente de 30-32°C (temperatura da água de 34° C). Após 10 minutos, os filhotes retornaram para suas respectivas mães. Este procedimento foi realizado do dia 1 ao dia 10 pós-natal, em seguida, os filhotes foram mantidos com a mãe, sem manipulação, até o dia 21 pós-natal.

*Habituação ao alimento novo:*

A partir do dia 60 de vida, os ratos foram habituados a um novo ambiente contendo um alimento novo. Uma porção de chocolate pesada previamente (chocolate ao leite – Neugebauer®) foi colocada em uma das extremidades da caixa-corredor. Os animais foram habituados a esse ambiente por 5 dias, durante 3 minutos cada dia, sob restrição alimentar (recebendo em torno de 80% do consumo habitual). No 6º dia, os ratos foram testados para o consumo de alimento palatável, após terem recebido ração padrão *ad libitum* nas 24 horas prévias. Esses procedimentos foram realizados para verificar se os animais comeriam chocolate da mesma forma que eles comumente ingerem outros tipos de alimentos palatáveis (9), com e sem restrição alimentar. Após esse período de habituação, os animais receberam ração padrão *ad libitum*.

*Exposição crônica ao alimento palatável na caixa-moradia:*

No 83º dia de vida, todos os animais foram pesados e randomizados em diferentes grupos do mesmo sexo, sendo colocados em números de 3 a 4 por caixa. Os grupos foram subdivididos em 1) Não-manipulado + ração padrão, 2) Não-manipulado + chocolate + ração padrão, 3) Manipulado + ração padrão e 4) Manipulado + chocolate + ração padrão. Uma semana depois, grupos específicos começaram a receber chocolate *ad libitum* na caixa-moradia. Durante 30 dias, porções previamente pesadas de chocolate e de ração padrão foram oferecidas, e a quantidade restante foi medida diariamente para avaliar o consumo. Os animais foram pesados uma vez por semana ao longo do período de exposição à dieta. Passados 30 dias de exposição à dieta palatável, os ratos foram sacrificados por decapitação após 6 horas de jejum. O consumo de alimentos foi medido por caixa e então dividido pelo número de animais em cada caixa para determinar o consumo médio por animal. Na análise estatística do consumo de alimentos, n representa o número de caixas. A Tabela 1 descreve a composição nutricional das dietas usadas no estudo.

*Coleta de sangue e dissecção da gordura abdominal:*

O sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados para determinação de insulina, glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídios e corticosterona. O plasma foi separado e congelado a - 20°C até o dia das análises.

As glândulas adrenais foram dissecadas e pesadas. As duas maiores porções da gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas. Tanto as glândulas adrenais quanto os depósitos de gordura abdominal foram pesados utilizando uma balança com precisão de 0,0001g.

#### *Análises bioquímicas:*

O plasma foi extraído com acetato de etila, e o extrato evaporado e dissolvido para avaliação da corticosterona utilizando um kit ELISA (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA). Os níveis de insulina plasmática também foram mensurados utilizando ELISA (Alpco Diagnostics, Merckodia AB, Uppsala, Suécia). A glicemia foi medida pelo método de glicose-oxidase (BioSystems, Barcelona, Espanha). Os níveis de colesterol total e de triglicerídios foram medidos com kits comerciais (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). O HDL-colesterol foi mensurado usando um kit proveniente do laboratório Wiener, Rosário, Argentina.

#### *Análise estatística:*

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de duas vias, três vias, ou de medidas repetidas, seguidas pelo teste post-hoc de Duncan, quando indicado. O nível de significância estabelecido foi de 5%. O tamanho amostral foi calculado como descrito acima.

## **RESULTADOS**

#### *Habituação ao chocolate (dias 1 a 5) e teste (dia 6)*

Durante a habituação ao chocolate, foi observado um aumento no consumo com o passar do tempo (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,001$ ,  $n = 22-25$ /grupo para machos e 15-20/grupo para fêmeas). Foi demonstrado um efeito do grupo no qual animais manipulados no período neonatal consumiram mais chocolate que animais não-manipulados ( $P = 0,007$ ). Animais manipulados também exibiram aumentos mais relevantes no consumo com o passar do tempo em comparação com não-manipulados (interação entre manipulação e tempo,  $P = 0,036$ ), sem nenhuma interação entre gênero e tempo ou grupo. Na sessão de teste (dia 6), ratos machos comeram mais que ratas fêmeas (ANOVA de duas vias,  $P = 0,023$ ), mas não havia efeito do grupo nem interação. Esses resultados são apresentados na Figura 1.

### *Consumo crônico de ração padrão e chocolate*

A Figura 2 mostra o consumo das duas dietas durante o período de 30 dias. Foram escolhidos arbitrariamente e analisados os consumos nos dias 1, 8, 15, 22 e 30 por uma ANOVA de medidas repetidas, utilizando o consumo médio de cada caixa. Os grupos que receberam chocolate diminuíram o consumo de ração padrão (Figura 2A e 2B;  $P=0,001$ ,  $n=3-4$  caixas/grupo), e ratos machos consumiram mais ração padrão que ratas fêmeas ( $P<0,001$ ). Havia uma interação entre tempo e dieta ( $P=0,009$ ) e tempo e gênero ( $P=0,008$ ), porém interações com o grupo não foram observadas.

Nas primeiras 24 horas de exposição ao chocolate, animais manipulados consumiram mais chocolate em comparação com animais não-manipulados no período neonatal (ANOVA de duas vias,  $P=0,044$ ,  $n=3-4$  caixas/grupo), porém não havia efeito do gênero, nem interação. Animais manipulados exibiram uma maior diminuição no consumo quando comparados com animais não-manipulados (ANOVA de medidas repetidas, interação entre tempo e grupo,  $P<0,001$ ) embora todos os animais tenham demonstrado uma redução no consumo com o passar do tempo ( $P<0,001$ ). Ratas fêmeas apresentaram uma diminuição mais discreta no consumo de chocolate (interação entre tempo e gênero,  $P=0,013$ ), especialmente as fêmeas não-manipuladas (interação entre tempo, grupo e gênero,  $P=0,021$ ). Esses resultados são apresentados nas Figuras 2C e 2D.

### *Preferência alimentar*

Para estimar a preferência pelo chocolate sobre a ração padrão, as kilocalorias derivadas do chocolate foram divididas pelo consumo calórico total. Todos os grupos exibiram uma diminuição na preferência pelo chocolate com o passar do tempo (ANOVA de medidas repetidas,  $P=0,005$ ,  $n=3-4$  caixas/grupo), e não foram observadas interações (Tabela 2).

### *Ingestão calórica*

Os grupos que receberam chocolate demonstraram uma maior ingestão calórica comparada com a dos grupos que receberam somente ração padrão (ANOVA de três vias,  $P<0,001$ ,  $n=3-4$  caixas/grupo), adicionalmente, ratos machos exibiram um consumo calórico aumentado ( $P<0,001$ ), porém isso não é observado quando o consumo é expresso em kilocalorias/gramas de peso corporal. A manipulação neonatal leva a um aumento da ingestão



calórica total, entretanto, esse resultado quase alcançou significância estatística ( $P=0,055$ ) quando comparado com o de animais não-manipulados (Figura 3A).

#### *Eficiência calórica*

Para determinar o ganho de peso corporal como um resultado da ingestão calórica, o ganho de peso em miligramas foi dividido pelo consumo calórico total no período de 30 dias. Ratos machos exibiram uma maior eficiência calórica que ratas fêmeas (ANOVA de três vias,  $P=0,003$ ,  $n= 3-4$  caixas/grupo), e não foram observados efeitos do grupo, da dieta, nem interações. Entretanto, quando analisados machos e fêmeas separadamente, ratos machos manipulados no período neonatal apresentaram uma eficiência calórica aumentada ( $P=0,050$ ), e não havia efeito da dieta, nem interações (Figura 3B).

#### *Ganho de peso corporal*

Animais que receberam chocolate (ANOVA de três vias,  $P=0,019$ ,  $n= 3-4$  caixas/grupo) e ratos machos ( $P<0,001$ ) apresentaram os maiores ganhos de peso corporal durante o período de 30 dias. Não havia efeito do grupo ( $P=0,066$ ), nem interações (Figura 3C).

Conforme apresentado na Figura 4, havia um efeito do gênero sobre o peso corporal (ANOVA de medidas repetidas,  $P<0,001$ ,  $n= 11-13$ /grupo para machos e  $n= 7-11$ /grupo para fêmeas), visto que ratos machos pesaram mais que ratas fêmeas. Enquanto todos os grupos aumentaram o peso corporal com o passar do tempo ( $P<0,001$ ), animais manipulados (interação tempo e grupo,  $P=0,011$ ), animais que foram expostos ao chocolate (interação tempo e dieta,  $P=0,008$ ) e ratos machos (interação tempo e gênero,  $P<0,001$ ) exibiram os maiores ganhos de peso. Foi observada uma interação entre tempo, grupo e gênero ( $P=0,012$ ), na qual ratos machos manipulados exibiram maior aumento no peso corporal com o passar do tempo. Uma interação entre grupo e gênero quase alcançou significância estatística ( $P=0,054$ ).

#### *Gordura abdominal*

O depósito de gordura abdominal é expresso em relação ao peso corporal de cada animal. Os grupos que consumiram chocolate apresentaram maiores depósitos de gordura abdominal (ANOVA de três vias,  $P<0,001$ ,  $n= 11-13$ /grupo para machos e  $9-12$ /grupo para

fêmeas), e esse depósito também apresentou-se maior em ratas fêmeas que em machos ( $P=0,002$ ). Uma interação marginalmente significativa entre dieta e gênero ( $P=0,07$ ) foi observada. Havia uma interação entre a manipulação neonatal, dieta e gênero ( $P=0,05$ ), demonstrando que ratas fêmeas não-manipuladas expostas à dieta palatável tinham um depósito de gordura abdominal aumentado, enquanto que ratas fêmeas manipuladas que receberam chocolate não diferiram do grupo que recebeu ração padrão (Figura 5).

#### *Glândulas adrenais*

As medidas da razão peso das adrenais/peso corporal (dados não mostrados) como também do peso das adrenais em valores absolutos foram realizadas (Figura 6). Em ambos os casos, o consumo de chocolate levou a uma diminuição no peso das glândulas adrenais (ANOVA de três vias,  $P<0,02$ ,  $n=11-13$ /grupo para machos e  $7-11$ /grupo para fêmeas). Ratos machos tinham uma menor razão peso das adrenais/peso corporal em comparação com ratas fêmeas ( $P<0,001$ ), e o mesmo resultado é observado quando expresso em valores absolutos. Não foi observado efeito do grupo ( $P>0,1$ ), nem interações.

#### *Níveis de lipídios no plasma*

Os resultados das medidas bioquímicas são apresentados na Tabela 3. Níveis mais altos de colesterol total foram observados nas ratas fêmeas em comparação com ratos machos (ANOVA de três vias,  $P<0,001$ ,  $n=11-13$ /grupo para machos e  $7-11$ /grupo para fêmeas), porém não havia efeito da dieta ( $P=0,467$ ), grupo ( $P=0,070$ ) ou interações. Nenhum efeito do grupo ( $P=0,499$ ), dieta ( $P=0,466$ ) ou gênero ( $P=0,163$ ) foi observado sobre os níveis de HDL-colesterol. O consumo de chocolate aumentou os níveis de triglicerídios no plasma ( $P<0,001$ ). Havia uma interação entre grupo e gênero, demonstrando que ratos machos não-manipulados tinham níveis mais altos de triglicerídios ( $P=0,024$ ), e nenhum efeito isolado do grupo ( $P=0,159$ ) ou gênero ( $P=0,146$ ) foi observado.

#### *Níveis plasmáticos de glicose, insulina e corticosterona*

Ratas fêmeas exibiram níveis mais altos de glicose no plasma comparados com os de ratos machos (ANOVA de três vias,  $P<0,001$ ,  $n=6-7$ /grupo). Não foram demonstrados efeitos da dieta ( $P=0,840$ ), grupo ( $P=0,380$ ) ou interações.

Os níveis basais de corticosterona não foram afetados pela manipulação neonatal, gênero ou dieta ( $P>0,05$ ,  $n= 5-7$ /grupo), e não haviam interações entre esses fatores. Os níveis de insulina plasmática, entretanto, foram mais baixos em ratas fêmeas que em ratos machos ( $P=0,012$ ,  $n= 6-7$ /grupo), e não foram demonstrados efeitos da manipulação neonatal, dieta ou interações ( $P>0,05$  para manipulação e dieta) (Tabela 4). Uma ANOVA de três vias analisando a razão glicose/insulina, mostrou um efeito significativo do gênero ( $P=0,001$ ), sem qualquer efeito da manipulação, dieta ou interações ( $P>0,05$ ). Adicionalmente, uma ANOVA de três vias do HOMA-IR (*Homeostasis Model Insulin Resistance Index*), utilizado para avaliar resistência à insulina, não mostrou efeito significativo do gênero, manipulação neonatal, dieta ou interações ( $P>0,05$ ; dados não apresentados).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, a manipulação neonatal foi associada com um consumo aumentado de chocolate na vida adulta, quando esse alimento foi oferecido por curtos períodos de tempo. Entretanto, quando expostos cronicamente ao chocolate, ratos machos manipulados no período neonatal exibiram uma redução importante no consumo com o passar do tempo, alcançando a quantidade consumida por ratos machos não-manipulados. Ratos machos manipulados também apresentaram um aumento mais saliente no peso corporal, maior eficiência calórica bem como níveis mais baixos de triglicerídios, sem nenhuma alteração na gordura abdominal. Fêmeas não-manipuladas, que foram expostas cronicamente ao chocolate na vida adulta, exibiram aumentado depósito de gordura abdominal em comparação com fêmeas manipuladas no período neonatal. Ratas fêmeas demonstraram níveis mais altos de colesterol total e glicose no plasma, assim como níveis mais baixos de insulina, quando comparados com os de ratos machos. Os animais que receberam chocolate também apresentaram uma redução no peso das glândulas adrenais.

Relatos prévios da literatura mostraram que sob restrição alimentar e durante curtos períodos de exposição, animais manipulados consomem mais alimento palatável que animais não-manipulados (9). Porém, quando expostos cronicamente a dietas enriquecidas com solução doce ou gordura, nenhuma diferença no consumo foi observada entre animais manipulados e não-manipulados no período neonatal (17). Pelo nosso conhecimento, o presente estudo é a primeira investigação na qual animais manipulados e não-manipulados no período neonatal são expostos cronicamente a uma dieta hiperpalatável, rica em açúcar como

também em gordura, tal como chocolate. Durante a exposição crônica a esse tipo de dieta, todos os animais demonstraram uma discreta diminuição no consumo de chocolate com o passar do tempo de exposição. Essa diminuição era esperada nos animais controles, já que o consumo aumentado de um alimento altamente calórico é conhecido por evocar respostas fisiológicas para ajustar a ingestão calórica, quando marcadores moleculares relacionados com o gasto energético e com o consumo de alimentos estão alterados (18). Ratos machos manipulados exibiram uma redução mais saliente no consumo de chocolate ao longo da primeira semana de tratamento, sugerindo uma diminuição na preferência pelo chocolate nesses animais. Por fim animais manipulados bem como não-manipulados demonstraram níveis semelhantes de consumo de chocolate. Estas mudanças no consumo de chocolate podem refletir uma adaptação dos animais a esse tipo de dieta quando oferecida cronicamente. Apesar dessa redução no consumo, todos os grupos ainda preferiam chocolate à ração padrão, visto que mais de 50% das kilocalorias consumidas eram derivadas do chocolate, e a ingestão calórica total estava aumentada nos animais que receberam chocolate.

Todos os grupos apresentaram aumento no peso corporal ao longo do tempo; entretanto o ganho de peso diferiu entre os grupos. Conforme esperado, ratos machos ganharam mais peso corporal em comparação com ratas fêmeas, e os animais que receberam chocolate também apresentaram uma maior ganho de peso, já que a ingestão calórica deles era maior. Animais manipulados durante o período neonatal demonstraram um maior ganho de peso com o passar do tempo, sendo esse efeito mais evidente em ratos machos. Essa foi uma observação interessante, visto que a ingestão calórica total não diferiu entre os animais manipulados e não-manipulados; portanto, o ganho de peso aumentado nos animais manipulados provavelmente está relacionado com a eficiência calórica também aumentada nesses animais. Este achado concorda com relatos prévios, avaliando camundongos machos, em que a manipulação neonatal aumentou o peso corporal e a eficiência calórica desses animais (19).

O consumo de chocolate aumentou o depósito de gordura abdominal, especialmente nas ratas fêmeas. No entanto, a manipulação neonatal atenuou o aumento da gordura abdominal em ratas fêmeas expostas ao chocolate. Outros estudos demonstraram que a manipulação neonatal e o cuidado materno têm um papel importante no desenvolvimento da função neuroendócrina, diminuindo a resposta do eixo HPA a um estresse agudo na vida adulta (7,20). No presente estudo, foi demonstrado que a manipulação neonatal, a qual é conhecida por aumentar o cuidado materno (21), modula o perfil metabólico dos animais que são cronicamente expostos a uma dieta altamente palatável. Os animais manipulados ganham

significativamente menos gordura abdominal que os não-manipulados quando expostos de forma crônica ao chocolate.

Os mecanismos pelos quais a manipulação neonatal induz a esse efeito protetor sobre o desenvolvimento do depósito de gordura abdominal são desconhecidos atualmente. Uma possível linha de investigação envolve o papel dos glicocorticóides no desenvolvimento da obesidade abdominal, já que esses hormônios têm ações diretas sobre o tecido adiposo (22). Animais manipulados no período neonatal, que foram anteriormente demonstrados por ter um mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides mais eficiente (23,24), poderiam responder diferentemente ao fluxo agudo de glicocorticóides que ocorre após uma refeição (25). Além disso, a sensibilidade do tecido aos glicocorticóides poderia estar envolvida nesse efeito. Porém, outros estudos são necessários para elucidar essas questões.

Outra possibilidade poderia ser uma alteração na regulação metabólica. Uma função simpatoadrenal diferencial foi relatada em animais manipulados no período neonatal (17), bem como um conteúdo de gordura abdominal aumentado nesses animais manipulados, diferentemente dos achados do presente estudo e de observações prévias (16). Entretanto, diferenças entre as espécies de animais e os protocolos de manipulação neonatal poderiam influenciar essas inconsistências.

O peso das glândulas adrenais apresentou-se diminuído nos grupos que receberam chocolate. Essa diminuição no peso das adrenais está de acordo com o conceito de “alimento confortante” proposto por Dallman et al. (26), em que dietas altamente calóricas e palatáveis podem diminuir a atividade do eixo HPA (26,27). No presente estudo não foram observadas diferenças nos níveis basais de corticosterona entre os diferentes grupos.

As medidas bioquímicas indicaram que ratos machos manipulados durante o período neonatal tinham níveis diminuídos de triglicerídios no plasma. Esse foi um achado interessante, visto que a exposição à dieta hiperpalatável aumentou os níveis de triglicerídios em todos os animais, exceto nos ratos machos manipulados cujos níveis de triglicerídios foram semelhantes aos dos animais controles. O perfil metabólico exibido pelos ratos machos manipulados que inclui maior peso corporal, sem alteração no depósito de gordura abdominal, aumentada eficiência calórica e níveis diminuídos de triglicerídios no plasma, sugere uma resposta metabólica particular desses animais no que diz respeito ao estoque e gasto de energia, quando expostos cronicamente a uma dieta altamente palatável.

Os níveis plasmáticos de colesterol total estavam aumentados nas ratas fêmeas, enquanto que a manipulação neonatal e a exposição à dieta não influenciaram essa medida. Este achado está de acordo com outros relatos da literatura (28,29). Os níveis de HDL-

colesterol e a razão colesterol total:HDL, que está relacionada com risco cardiovascular aumentado, foram semelhantes entre os diferentes grupos. Por outro lado, 30 dias de exposição ao chocolate foram suficientes para aumentar significativamente o depósito de gordura abdominal nas ratas fêmeas não-manipuladas. Então, estudos futuros poderão esclarecer de que maneira a manipulação neonatal poderia mediar o desenvolvimento de fatores de risco para doença cardiovascular.

Ratas fêmeas apresentaram níveis aumentados de glicose no plasma comparados com os de ratos machos. Por outro lado, os níveis de insulina eram mais baixos nas fêmeas. Esses efeitos do gênero sobre a insulina foram observados em outros estudos utilizando ratos (29,30), entretanto, as concentrações de glicose sanguínea frequentemente tendem a ser semelhantes entre machos e fêmeas (30,31). Estudos prévios mostraram efeitos permanentes da manipulação no período pré-natal sobre a função do eixo HPA e fatores de risco cardiovascular; e esses efeitos tendem a ser gênero-específicos (31,32). No presente estudo, pode-se sugerir que o desfecho de uma manipulação pós-natal pode ter uma influência gênero-específica sobre o perfil metabólico de animais expostos cronicamente a uma dieta palatável.

Assim, pode-se concluir que animais adultos manipulados durante o período neonatal demonstraram um consumo aumentado de alimento palatável quando expostos a esse tipo de dieta durante curtos períodos de tempo. Essa diferença no consumo declinou quando os animais foram cronicamente expostos à dieta hiperpalatável. Animais manipulados tinham níveis mais baixos de triglicerídios, bem como aumentado peso corporal e eficiência calórica. Além disso, a manipulação neonatal induziu à uma influência protetora gênero-específica sobre o depósito de gordura abdominal das ratas fêmeas que foram expostas cronicamente ao chocolate. Todas essas observações sugerem um padrão metabólico específico, relacionado com estoque e gasto de energia, de animais manipulados durante o período neonatal, e os efeitos da manipulação tenderam a ser gênero-dependentes.

## **REFERÊNCIAS**

1. Wright CM, Parkinson KN, Drewett RF 2006 How does maternal and child feeding behavior relate to weight gain and failure to thrive? Data from a prospective birth cohort. *Pediatrics* 117:1262-1269
2. Burdette HL, Whitaker RC, Hall WC, Daniels SR 2006 Maternal infant-feeding style and children's adiposity at 5 years of age. *Arch Pediatr Adolesc Med* 160:513-520

3. Faith MS, Heshka S, Keller KL, Sherry B, Matz PE, Pietrobelli A, Allison DB 2003 Maternal-child feeding patterns and child body weight: findings from a population-based sample. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157:926-932
4. Zhang TY, Bagot R, Parent C, Nesbitt C, Bredy TW, Caldji C, Fish E, Anisman H, Szyf M, Meaney MJ 2006 Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. *Biol Psychol* 73:72-89
5. Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ 2001 Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12736-12741
6. Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A 2004 Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [<sup>11</sup>C] raclopride. *J Neurosci* 24:2825-2831
7. Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH 1967 Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav* 2:55-59
8. Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB 2001 Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 115:1332-1340
9. Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, Dantas G, Torres IL, Lucion AB, Dalmaz C 2004 Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav* 80:739-745
10. Fichter MM, Pirke KM, Pollinger J, Wolfram G, Brunner E 1990 Disturbances in the hypothalamo-pituitary-adrenal and other neuroendocrine axes in bulimia. *Biol Psychiatry* 27:1021-1037
11. Kaye WH, Rubinow D, Gwirtsman HE, George DT, Jimerson DC, Gold PW 1988 CSF somatostatin in anorexia nervosa and bulimia: relationship to the hypothalamic pituitary-adrenal cortical axis. *Psychoneuroendocrinology* 13:265-272
12. Pecoraro N, Gomez F, Dallman MF 2005 Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology* 30:815-825
13. Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M 2005 Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes* 54:197-203

14. Brunner EJ, Hemingway H, Walker BR, Page M, Clarke P, Juneja M, Shipley MJ, Kumari M, Andrew R, Seckl JR, Papadopoulos A, Checkley S, Rumley A, Lowe GD, Stansfeld SA, Marmot MG 2002 Adrenocortical, autonomic, and inflammatory causes of the metabolic syndrome: nested case-control study. *Circulation* 106:2659-2665
15. Duclos M, Marquez Pereira P, Barat P, Gatta B, Roger P 2005 Increased cortisol bioavailability, abdominal obesity, and the metabolic syndrome in obese women. *Obes Res* 13:1157-1166
16. Silveira PP, da Silva Benetti C, Ayres C, Pederiva FQ, Portella AK, Lucion AB, Dalmaz C 2006 Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav Brain Res* 173:205-210
17. Young JB 2000 Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1745-1752
18. Archer ZA, Rayner DV, Duncan JS, Bell LM, Mercer JG 2005 Introduction of a high-energy diet acutely up-regulates hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript, Mc4R and brown adipose tissue uncoupling protein-1 gene expression in male Sprague-Dawley rats. *J Neuroendocrinol* 17:10-17
19. Loizzo A, Loizzo S, Galiotta G, Caiola S, Spampinato S, Campana G, Seghieri G, Ghirlanda G, Franconi F 2006 Overweight and metabolic and hormonal parameter disruption are induced in adult male mice by manipulations during lactation period. *Pediatr Res* 59:111-115
20. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ 1997 Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662
21. Pryce CR, Bettschen D, Feldon J 2001 Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol* 38:239-251
22. 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
23. Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A 1989 Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* 50:597-604
24. Ader R, Grotta LJ 1969 Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiol Behav* 4:303-305
25. Follenius M, Brandenberger G, Hietter B 1982 Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals. *J Clin Endocrinol Metab* 55:757-761



26. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S 2003 Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". Proc Natl Acad Sci U S A 100:11696-11701
27. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF 2004 Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. Endocrinology 145:3754-3762
28. Nevala R, Vaskonen T, Vehniainen J, Korpela R, Vapaatalo H 2000 Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. Life Sci 66:115-124
29. Slotkin TA, Brown KK, Seidler FJ 2005 Developmental exposure of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. Environ Health Perspect 113:1291-1294
30. Sugden MC, Holness MJ 2002 Gender-specific programming of insulin secretion and action. J Endocrinol 175:757-767
31. O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC 2004 Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. Am J Physiol Endocrinol Metab 287:E863-870
32. Liu L, Li A, Matthews SG 2001 Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. Am J Physiol Endocrinol Metab 280:E729-739

## LEGENDAS PARA FIGURAS

**Figura 1:** Consumo agudo de chocolate em animais adultos manipulados e não-manipulados no período neonatal. □ não-manipulado; ■ manipulado. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito da manipulação durante a habituação ao chocolate ( $P=0,007$ ). Dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (A) Consumo de chocolate durante a habituação em machos,  $N= 22-25$  animais/grupo. (B) Consumo de chocolate durante a habituação em fêmeas,  $N= 15-20$  animais/grupo. (C) Chocolate consumido na sessão de teste. Ratos machos consumiram mais chocolate que ratas fêmeas (ANOVA de duas vias,  $P=0,023$ ).

**Figura 2:** Consumo crônico de ração padrão e chocolate em animais adultos manipulados e não-manipulados. Dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (A) Consumo médio de ração padrão em machos. (B) Consumo médio de ração padrão em fêmeas. □ NM\_ração; ■

NM\_chocolate;  $\Delta$  M\_ração;  $\blacktriangle$  M\_chocolate. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito da dieta, gênero e interações entre tempo x dieta e tempo x gênero ( $P < 0,01$ ). (C) Consumo médio de chocolate em machos. (D) Consumo médio de chocolate em fêmeas.  $N = 3-4$  caixas/grupo.  $\square$  não-manipulado;  $\blacksquare$  manipulado. Machos manipulados exibiram uma diminuição mais saliente no consumo de chocolate com o passar do tempo (ANOVA de medidas repetidas,  $P = 0,021$ ).

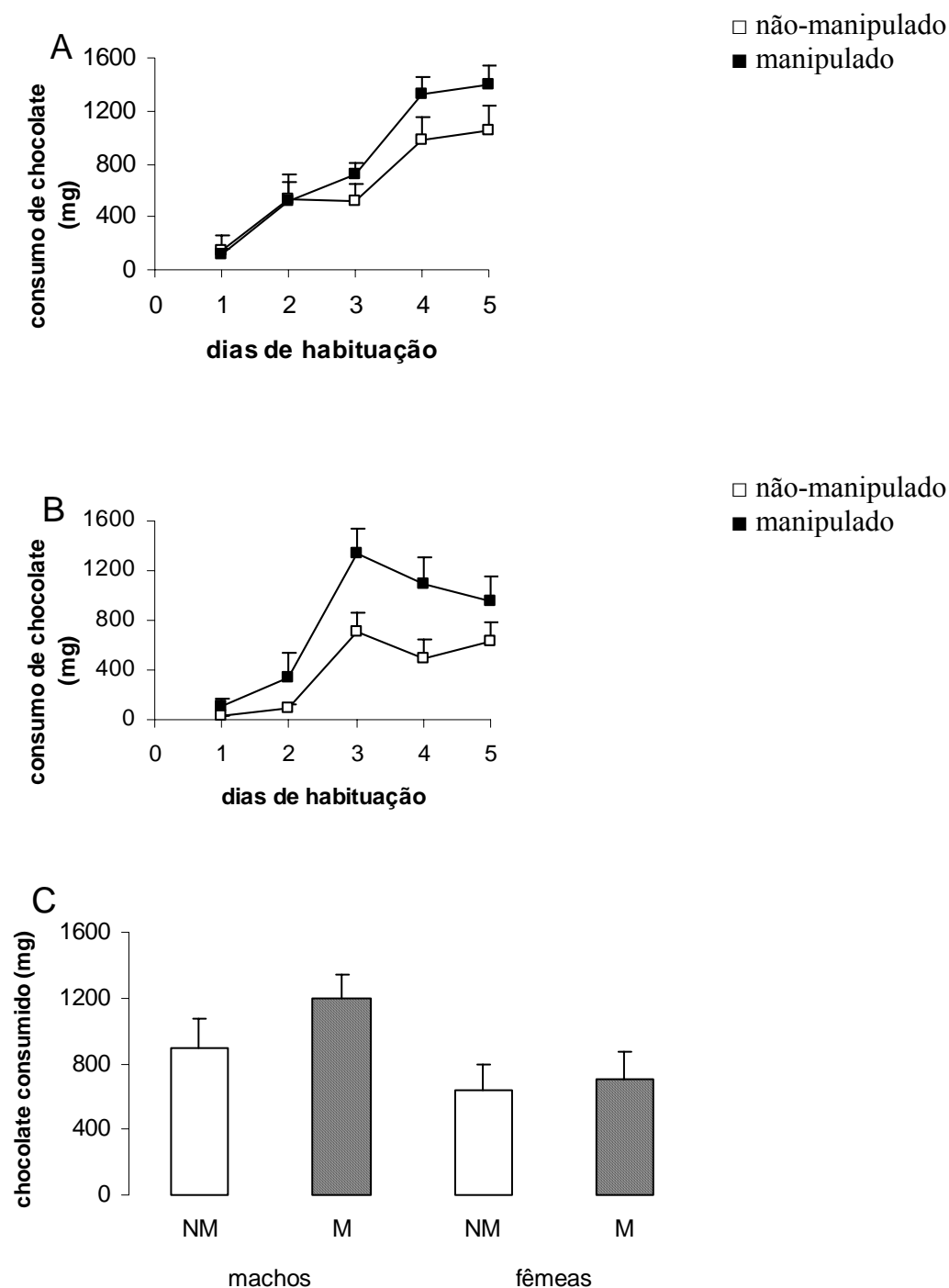
**Figura 3:** Ingestão calórica total, eficiência calórica e ganho de peso corporal durante a exposição crônica em animais manipulados e não-manipulados, machos e fêmeas.  $\square$  ração;  $\blacksquare$  ração+chocolate. Dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (A) Consumo calórico total. (B) Eficiência calórica, calculada pela razão ganho de peso corporal/kcal consumidas. (C) Ganho de peso corporal.  $N = 3-4$  caixas/grupo. ANOVA de três vias mostrou maior ingestão calórica ( $P < 0,001$ ) e ganho de peso corporal ( $P = 0,019$ ), nos grupos que receberam chocolate. Machos manipulados exibiram uma eficiência calórica aumentada ( $P = 0,050$ ).

**Figura 4:** Peso corporal durante a exposição crônica ao chocolate em animais adultos manipulados e não-manipulados.  $\square$  NM\_ração;  $\blacksquare$  NM\_chocolate;  $\Delta$  M\_ração;  $\blacktriangle$  M\_chocolate. (A) Peso corporal médio em machos.  $N = 11-13$  animais/grupo. (B) Peso corporal médio em fêmeas.  $N = 7-11$  animais/grupo. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito do gênero, dieta e interações entre tempo x grupo, tempo x gênero, tempo x dieta e tempo x gênero x grupo ( $P < 0,050$ ).

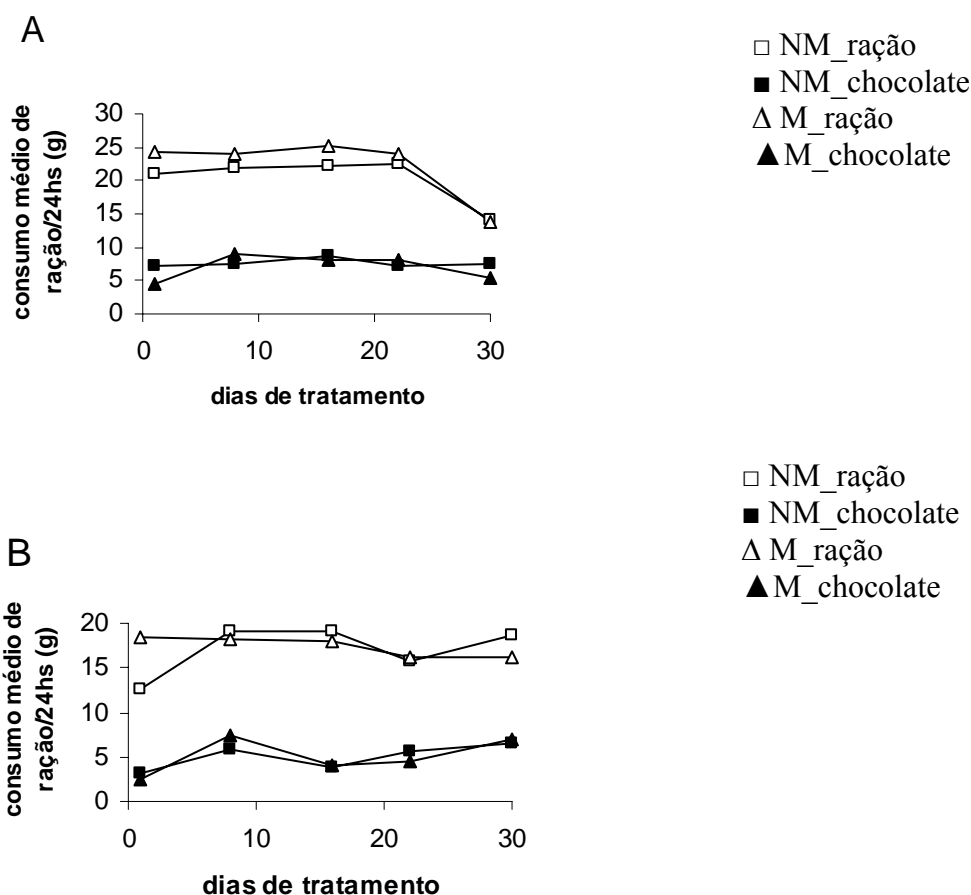
**Figura 5:** Depósito de gordura abdominal, expresso em média  $\pm$  E.P.M. da razão gordura abdominal/peso corporal.  $N = 11-13$ /grupo para machos e  $9-12$ /grupo para fêmeas.  $\square$  ração;  $\blacksquare$  ração+chocolate. ANOVA de três vias mostrou efeitos da dieta ( $P < 0,001$ ), gênero ( $P = 0,002$ ), e uma interação entre grupo x dieta x gênero ( $P = 0,05$ ).

\* Significativamente diferente dos outros grupos (Post-hoc de Duncan,  $P = 0,05$ ).

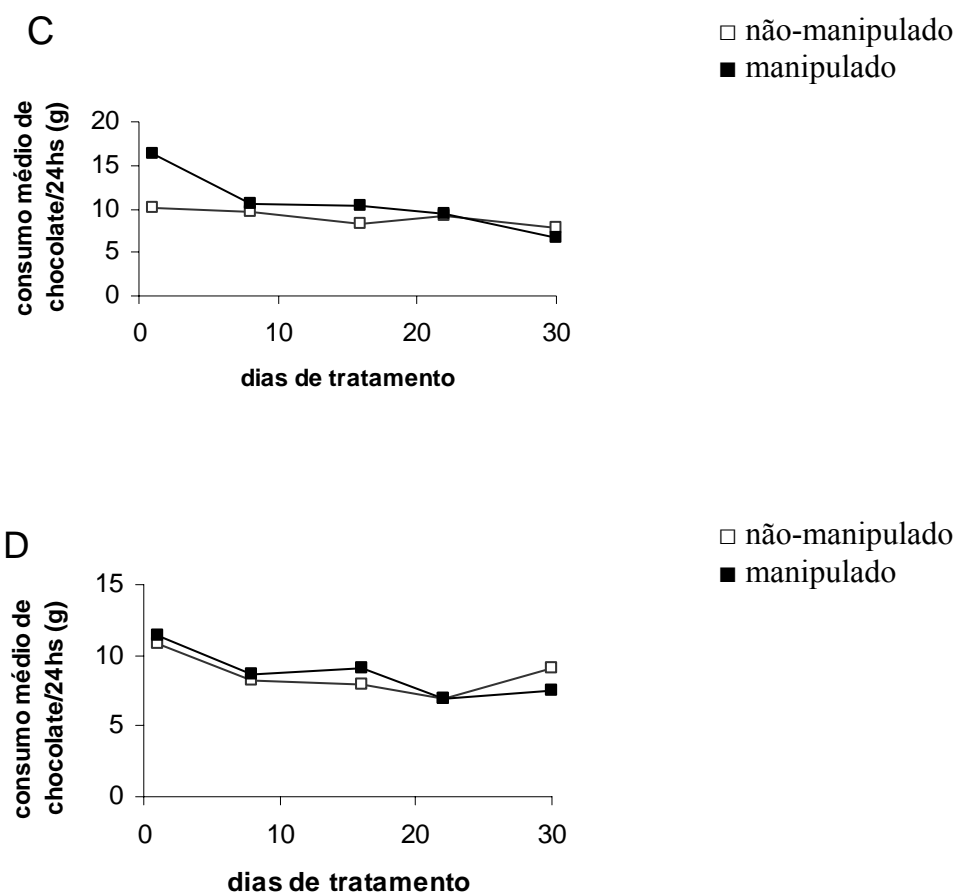
**Figura 6:** Peso das glândulas adrenais, expresso em média  $\pm$  E.P.M.  $N = 11-13$ /grupo para machos e  $7-11$ /grupo para fêmeas.  $\square$  ração;  $\blacksquare$  ração+chocolate. ANOVA de três vias mostrou um efeito da dieta ( $P < 0,02$ ), e do gênero ( $P < 0,001$ ).



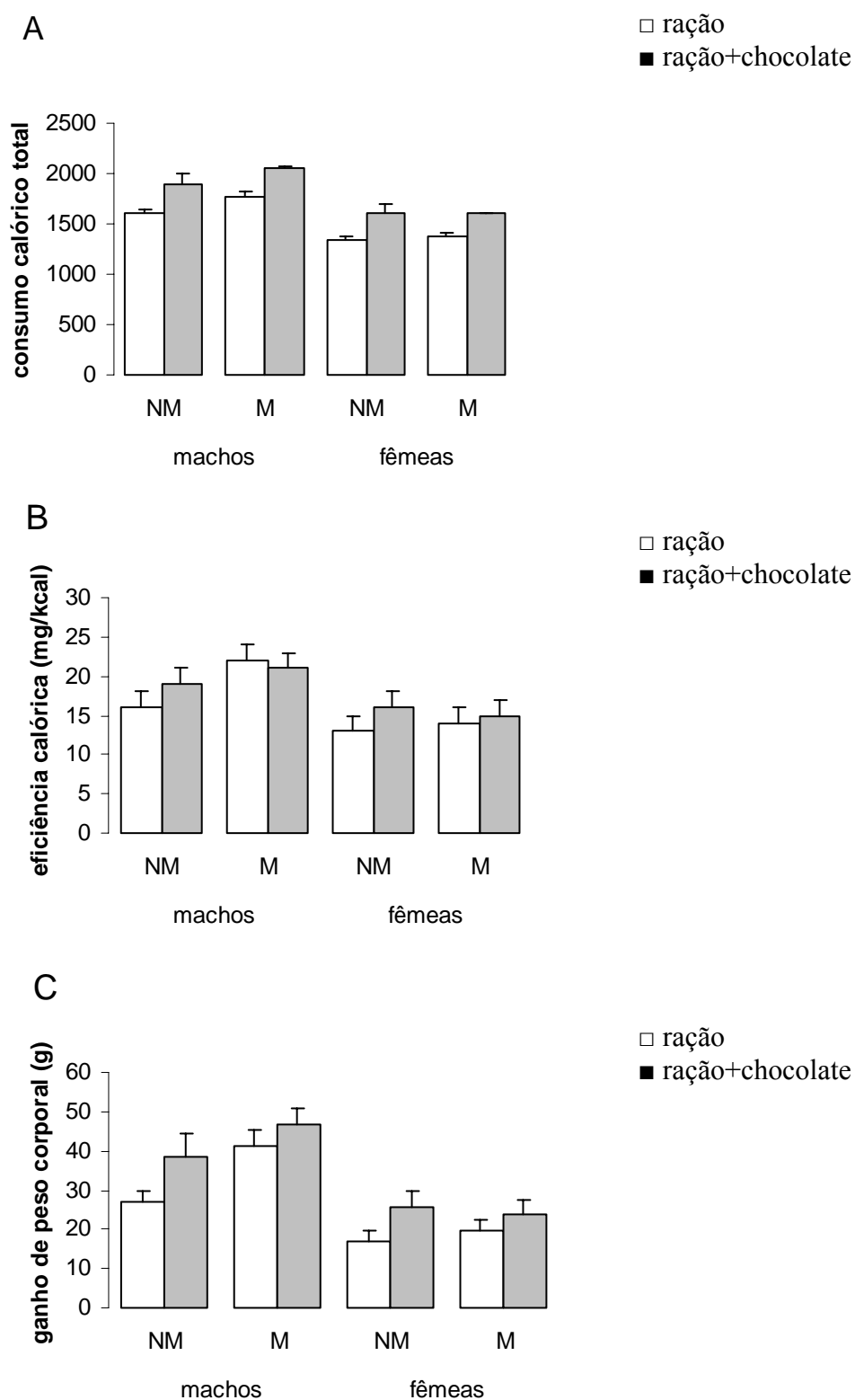
**Figura 1:** Consumo agudo de chocolate em animais adultos manipulados e não-manipulados no período neonatal. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito da manipulação durante a habituação ao chocolate ( $P=0,007$ ). Dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (A) Consumo de chocolate durante a habituação em machos,  $N= 22-25$  animais/grupo. (B) Consumo de chocolate durante a habituação em fêmeas,  $N= 15-20$  animais/grupo. (C) Chocolate consumido na sessão de teste. Ratos machos consumiram mais chocolate que ratas fêmeas (ANOVA de duas vias,  $P=0,023$ ).



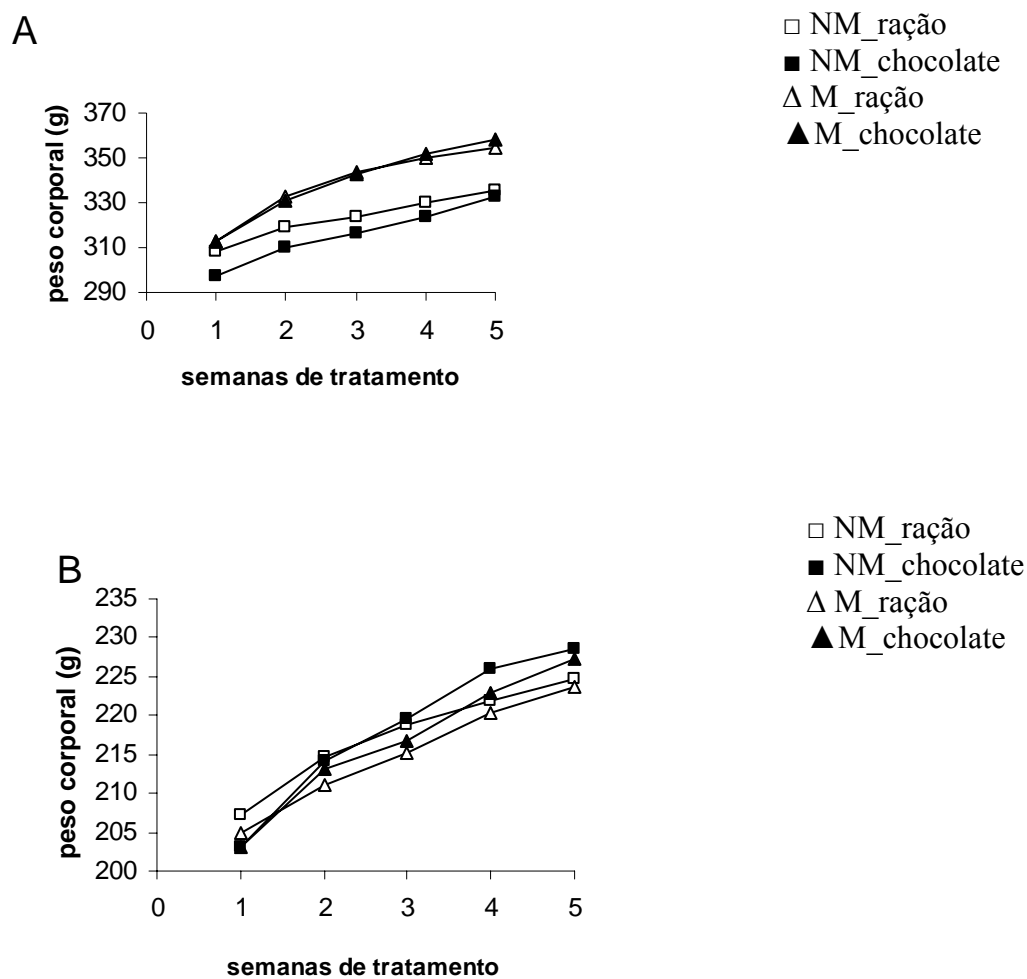
**Figura 2:** Consumo crônico de ração padrão e chocolate em animais adultos manipulados e não-manipulados. Dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (A) Consumo médio de ração padrão em machos. (B) Consumo médio de ração padrão em fêmeas. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito da dieta, gênero e interações entre tempo x dieta e tempo x gênero ( $P < 0,01$ ). (C) Consumo médio de chocolate em machos. (D) Consumo médio de chocolate em fêmeas.  $N = 3-4$  caixas/grupo. Machos manipulados exibiram uma diminuição mais saliente no consumo de chocolate com o passar do tempo (ANOVA de medidas repetidas,  $P = 0,021$ ).



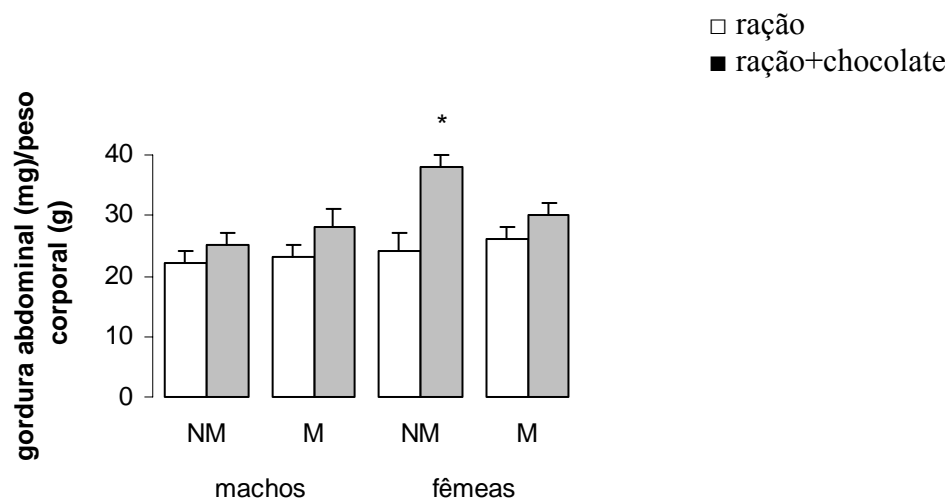
**Figura 2:** Consumo crônico de ração padrão e chocolate em animais adultos manipulados e não-manipulados. Dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (A) Consumo médio de ração padrão em machos. (B) Consumo médio de ração padrão em fêmeas. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito da dieta, gênero e interações entre tempo x dieta e tempo x gênero ( $P < 0,01$ ). (C) Consumo médio de chocolate em machos. (D) Consumo médio de chocolate em fêmeas.  $N = 3-4$  caixas/grupo. Machos manipulados exibiram uma diminuição mais saliente no consumo de chocolate com o passar do tempo (ANOVA de medidas repetidas,  $P = 0,021$ ).



**Figura 3:** Ingestão calórica total, eficiência calórica e ganho de peso corporal durante a exposição crônica em animais manipulados e não-manipulados, machos e fêmeas. Dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (A) Consumo calórico total. (B) Eficiência calórica, calculada pela razão ganho de peso corporal/kcal consumidas. (C) Ganho de peso corporal.  $N= 3-4$  caixas/grupo. ANOVA de três vias mostrou maior ingestão calórica ( $P<0,001$ ) e ganho de peso corporal ( $P=0,019$ ), nos grupos que receberam chocolate. Machos manipulados exibiram uma eficiência calórica aumentada ( $P=0,050$ ).

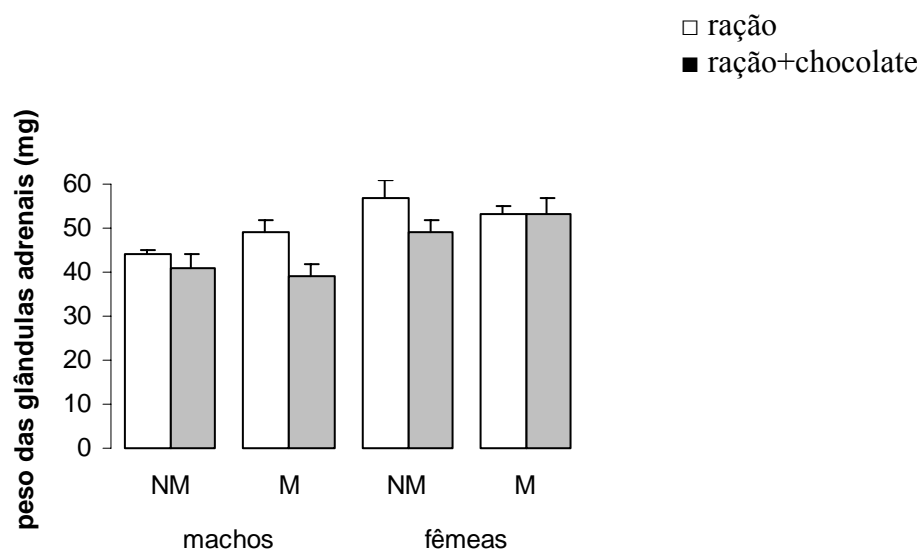


**Figura 4:** Peso corporal durante a exposição crônica ao chocolate em animais adultos manipulados e não-manipulados. (A) Peso corporal médio em machos.  $N= 11-13$  animais/grupo. (B) Peso corporal médio em fêmeas.  $N= 7-11$  animais/grupo. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito do gênero, dieta e interações entre tempo x grupo, tempo x gênero, tempo x dieta e tempo x gênero x grupo ( $P<0,050$ ).



**Figura 5:** Depósito de gordura abdominal, expresso em média  $\pm$  E.P.M. da razão gordura abdominal/peso corporal.  $N= 11-13$ /grupo para machos e  $9-12$ /grupo para fêmeas. ANOVA de três vias mostrou efeitos da dieta ( $P<0,001$ ), gênero ( $P=0,002$ ), e uma interação entre grupo x dieta x gênero ( $P=0,05$ ). \* Significativamente diferente dos outros grupos (Post-hoc de Duncan,  $P= 0,05$ ).





**Figura 6:** Peso das glândulas adrenais, expresso em média  $\pm$  E.P.M.  $N= 11-13$ /grupo para machos e  $7-11$ /grupo para fêmeas. ANOVA de três vias mostrou um efeito da dieta ( $P<0,02$ ), e do gênero ( $P<0,001$ ).

**Tabela 1.** Composição de macronutrientes das dietas / 100g de alimento utilizado no estudo. HC, carboidrato.

Alimentos	Kcalorias	HC (g)	Proteína (g)	Gordura (g)	Fibra (g)
Ração padrão	290	56	22	4.5	4.92
Chocolate	544	64	4.4	30.4	0

**Tabela 2.** Preferência pelo chocolate de animais manipulados e não-manipulados.

Gênero	Grupo	Dia 1	Dia 8	Dia 15	Dia 22	Dia 30
Machos	NM	0.72±0.08	0.71±0.01	0.66±0.06	0.70±0.08	0.68±0.05
	M	0.87±0.03	0.69±0.04	0.70±0.04	0.69±0.02	0.67±0.05
Fêmeas	NM	0.88±0.04	0.72±0.02	0.80±0.05	0.69±0.03	0.74±0.06
	M	0.90±0.06	0.69±0.04	0.80±0.07	0.76±0.05	0.67±0.03

Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.  $N = 3-4$  caixas/grupo. Preferência pelo chocolate diminuiu com o passar do tempo (ANOVA de três vias, efeito do tempo,  $P=0,005$ ). NM, não-manipulado; M, manipulado.

**Tabela 3.** Níveis de lipídios no plasma (mg/dL) de animais manipulados e não-manipulados recebendo ração padrão com ou sem chocolate *ad libitum*.

Grupo			CT	HDL-C	TG
Machos	NM	Ração	43.4±2.5	26.3±2.9	118.1±16.6
		Ração+choco	42.4±1.5	26.6±4.4	196.1±25.7*
	M	Ração	39.3±1.7	24.4±3.5	76.3±6.8
		Ração+choco	39.8±1.7	24.6±3.6	135.1±10.0
Fêmeas	NM	Ração	53.9±3.7	31.0±3.7	78.9±10.1
		Ração+choco	48.3±2.9	30.1±5.2	131.1±8.8
	M	Ração	47.2±5.1	24.0±5.2	101.2±8.8
		Ração+choco	47.8±2.1	33.0±4.2	133.2±27.8

Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.  $N = 11-13$ /grupo para machos e 7-11/grupo para fêmeas. CT, colesterol total; HDL-C, *high-density lipoprotein cholesterol*; TG, triglicerídios. O consumo de chocolate aumentou os níveis de TG nos machos e nas fêmeas (ANOVA de três vias, efeito da dieta,  $P < 0,001$ ). Nos ratos machos, a manipulação neonatal diminuiu os níveis de TG (ANOVA de três vias, interação entre grupo e gênero,  $P = 0,024$ ). Ratas fêmeas apresentaram níveis mais altos de colesterol total que ratos machos (ANOVA de três vias, efeito do gênero,  $P < 0,001$ ).

\* Significativamente diferente dos outros grupos (Post-hoc de Duncan,  $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Níveis plasmáticos de glicose (mg/dL), insulina ( $\mu\text{g/L}$ ) e corticosterona (ng/mL) de animais manipulados e não-manipulados recebendo ração padrão com ou sem chocolate *ad libitum*.

	Grupo		Glicose	Insulina	Corticosterona
Machos	NM	Ração	130.59 $\pm$ 6.3	1.86 $\pm$ 0.3	136.04 $\pm$ 38.6
		Ração+choco	126.22 $\pm$ 4.7	1.85 $\pm$ 0.2	170.67 $\pm$ 32.8
	M	Ração	139.25 $\pm$ 6.4	1.74 $\pm$ 0.4	182.4 $\pm$ 47.7
		Ração+choco	127.00 $\pm$ 2.3	2.02 $\pm$ 0.3	177.90 $\pm$ 18.1
Fêmeas	NM	Ração	163.55 $\pm$ 4.7	1.14 $\pm$ 0.4	260.06 $\pm$ 42.9
		Ração+choco	169.34 $\pm$ 4.5	1.30 $\pm$ 0.3	210.79 $\pm$ 34.7
	M	Ração	150.43 $\pm$ 9.2	1.37 $\pm$ 0.4	190.47 $\pm$ 47.1
		Ração+choco	157.78 $\pm$ 8.2	1.25 $\pm$ 0.3	172.17 $\pm$ 39.2

Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.  $N = 6-7/\text{grupo}$  (glicose).  $N = 5-7/\text{grupo}$  (corticosterona).  $N = 6-7/\text{grupo}$  (insulina). Ratas fêmeas apresentaram níveis mais altos de glicose e níveis mais baixos de insulina que ratos machos (ANOVA de três vias, efeito do gênero,  $P < 0,001$  para glicose e  $P = 0,012$  para insulina).

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com os achados deste trabalho, discutidos no artigo, foi observado que a manipulação no período neonatal está associada com um aumento no consumo de chocolate na vida adulta, quando este alimento é oferecido durante curtos períodos de tempo, como na habituação ao chocolate em um ambiente diferente da caixa-moradia. Estes resultados concordam com outros relatos da literatura de aumento no consumo de alimentos palatáveis em animais que sofreram manipulação neonatal, estando os mesmos em um ambiente distinto ou na própria caixa-moradia (SILVEIRA et al., 2004, 2006). Resultados semelhantes também foram observados em ratos manipulados durante 15 minutos nas primeiras 3 semanas de vida (MCINTOSH et al., 1999). Períodos mais longos de separação materna parecem alterar o comportamento alimentar, realçando a hiperfagia de rebote após um período de restrição alimentar, especialmente em fêmeas (IWASAKI et al., 2000).

O consumo aumentado de alimentos palatáveis, em animais que sofreram manipulação neonatal, foi anteriormente observado durante períodos reduzidos de tempo como 3 minutos (SILVEIRA et al., 2004, 2005), 10 minutos (SILVEIRA et al., 2006) e 30 minutos de exposição (MCINTOSH et al., 1999); entretanto, em períodos mais longos de exposição de aproximadamente 7 semanas, esses animais parecem não apresentar alterações no consumo de dietas enriquecidas em açúcar ou gordura (YOUNG, 2000). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de uma exposição crônica, composta por um período de 30 dias, a uma dieta palatável, rica em açúcar e gordura (chocolate), em animais adultos que foram submetidos à manipulação nos primeiros 10 dias após o nascimento. É importante ressaltar que os animais tiveram livre acesso ao chocolate, mas igualmente lhes foi fornecida ração padrão e água *ad libitum*.

Durante o período de exposição crônica em que o chocolate encontrou-se totalmente disponível para consumo, uma saliente redução na ingestão de chocolate ao longo do tempo foi observada nos ratos machos manipulados, alcançando os mesmos níveis de consumo dos animais controles (não manipulados) após poucos dias; com base neste achado pode ser sugerida uma diminuição na preferência pelo alimento palatável, em relação ao controles,

identificável durante a primeira semana de exposição. Estas mudanças no consumo de chocolate, observadas em períodos longos versus curtos de exposição, podem refletir uma adaptação dos animais a este tipo de dieta quando oferecida de maneira crônica. Mesmo havendo uma redução na preferência pelo chocolate com o passar do tempo, os animais ainda preferiram chocolate à ração, visto que mais de 50% das calorias ingeridas em todos os grupos foram originadas do chocolate. Isto poderia estar relacionado com relatos prévios de que as propriedades orosensoriais do chocolate e o desejo por uma satisfação sensorial são suficientes para explicar a motivação para consumir chocolate (WEINGARTEN, ELSTON, 1990; MICHENER, ROZIN, 1994).

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento no peso ao longo do tratamento, o que é comum nesse tipo de animais. No entanto, o ganho de peso foi diferente entre os grupos: machos ganharam mais peso em relação às fêmeas, o que era esperado. Adicionalmente, os animais que receberam chocolate ganharam mais peso, e sua ingestão calórica foi maior. Foi observado também que os animais manipulados no período neonatal, quando adultos, apresentaram um maior ganho de peso corporal em relação aos controles, e este efeito destacou-se especialmente nos machos. Esta observação foi bem interessante já que o consumo calórico total não diferiu entre os animais manipulados e controles; dessa forma, o maior ganho de peso corporal naqueles que sofreram manipulação neonatal, principalmente nos machos, provavelmente esteja relacionado à maior eficiência calórica desses animais, podendo-se pensar em um efeito da manipulação neonatal induzindo alterações permanentes na resposta metabólica. Estes achados estão de acordo com relatos recentes de manipulação neonatal em camundongos machos, onde se observa que os animais manipulados, quando adultos, apresentam peso corporal aumentado e maior eficiência calórica em relação aos controles (LOIZZO et al., 2006).

O consumo de chocolate aumentou o depósito de gordura abdominal e esse aumento foi mais expressivo nas fêmeas. Por outro lado, a intervenção durante o período neonatal atenuou o aumento da gordura abdominal após exposição à dieta palatável, sendo este efeito mais evidente nas fêmeas. Outros estudos têm demonstrado que tanto a manipulação neonatal quanto o cuidado materno, desempenham um papel importante no desenvolvimento da função neuroendócrina, levando a uma redução na resposta do eixo HPA ao estresse (LEVINE et al., 1967; LIU et al., 1997). Conforme o presente trabalho, a manipulação neonatal, a qual é conhecida por acentuar o cuidado maternal (BRANCHI et al., 2001; PRYCE et al., 2001),

pode ser pensada por afetar o perfil metabólico quando esses animais são expostos cronicamente a uma dieta altamente palatável, de forma a protegê-los contra os efeitos deletérios desta alimentação hipercalórica, pelo menos no que se refere ao depósito de gordura abdominal.

Embora os mecanismos envolvidos neste efeito protetor da manipulação neonatal ainda sejam desconhecidos, algumas possibilidades podem ser destacadas. Sabe-se que após uma refeição ocorre uma rápida secreção de glicocorticóides (FOLLENIUS et al., 1982), e sabe-se, além disso, que os esteróides estão envolvidos no acúmulo de gordura abdominal (DALLMAN et al., 2002; LA FLEUR et al., 2004). Adicionalmente, um aumento nos níveis de GCs no tecido adiposo em um modelo transgênico de camundongos machos foi sugerido como um mecanismo envolvido na obesidade abdominal (MASUZAKI et al., 2001). Dessa forma, neste trabalho, os animais manipulados no período neonatal, que são conhecidos por apresentarem um mecanismo de retroalimentação negativa mais eficiente (MEANEY et al., 1989; ADER, GROTA, 1969), poderiam responder diferentemente a uma exposição aguda aos GCs decorrente de uma refeição. Até mesmo a sensibilidade do tecido adiposo para os GCs poderia estar envolvida nesta proteção, porém isto não foi avaliado no presente trabalho. No entanto, até o momento atual, estas observações não conseguem explicar os efeitos sexo-específicos identificados em relação ao depósito de gordura abdominal. Portanto, estudos adicionais serão necessários para elucidar tais questões.

Outra explicação possível para o efeito protetor da manipulação neonatal observado neste trabalho, atenuando o acúmulo de gordura abdominal após um período de exposição crônica ao chocolate, seria uma alteração na regulação metabólica desses animais. Relatos prévios mostram que a manipulação no início da vida exerce efeitos divergentes sobre a função simpato-adrenal de machos adultos, diminuindo a atividade do sistema nervoso simpático e aumentando a função medular adrenal (YOUNG, 2000), bem como determina um maior depósito de gordura abdominal nesses animais, o que difere dos achados deste trabalho e de observações anteriores (SILVEIRA et al., 2006). Porém, tais inconsistências nos achados podem ser devido à influência de diferenças metodológicas no procedimento de manipulação neonatal e na espécie dos animais testados.

Os animais que receberam chocolate demonstraram uma diminuição no peso das glândulas adrenais, contudo nenhum efeito da manipulação foi observado e não havia diferença nos níveis de corticosterona basal. Este reduzido peso das adrenais está de acordo



com a proposta desenvolvida por Dallman et al. (2003), os quais sugerem a expressão “*comfort food*”, demonstrando que dietas altamente palatáveis e calóricas reduzem a atividade do eixo HPA (PECORARO et al., 2004; DALLMAN et al., 2004, 2003). Sabe-se que, em situações de estresse, níveis elevados de GCs agem estimulando o consumo de alimentos palatáveis e tem sido proposto que esses níveis elevados de GCs, combinados com níveis também elevados de insulina, aumentam os estoques de energia abdominal, de onde seriam emitidos sinais que atuariam sobre o cérebro para exacerbar o mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides (DALLMAN et al., 2004).

Embora no presente trabalho nenhum efeito da intervenção neonatal sobre os níveis basais de corticosterona tenha sido observado, existem relatos de níveis basais elevados de corticosterona em camundongos adultos manipulados no período neonatal (LOIZZO et al., 2006), no entanto, o procedimento de manipulação, diferentemente da metodologia abordada neste trabalho, é acompanhado de injeção de solução salina, o que induz um maior estresse no animal. Além disso, diferenças espécie-específicas devem ser consideradas. Assim, é possível que os animais expostos cronicamente ao chocolate, embora apresentassem níveis de corticosterona normais, tenham uma maior sensibilidade à ação de retroalimentação negativa dos GCs, como demonstrado em estudos anteriores (MEANEY et al., 1989; ADER, GROTA, 1969) e poderiam, então, apresentar uma reduzida resposta quando expostos a uma situação de estresse. Estudos posteriores serão necessários para averiguar essa hipótese.

As análises bioquímicas realizadas neste trabalho indicaram que o procedimento de manipulação neonatal altera o metabolismo dos lipídios sanguíneos, levando a uma redução nos níveis de triglicerídeos plasmáticos em animais machos. Esta observação é bastante relevante, pois a exposição à dieta altamente palatável induziu um aumento na trigliceridemia, porém ratos machos manipulados que receberam chocolate apresentaram níveis de triglicerídeos mais baixos em comparação aos dos animais controles que também receberam chocolate. Este efeito da manipulação neonatal observado no presente trabalho não foi demonstrado por outros autores, os quais relatam níveis elevados de triglicerídeos em camundongos machos manipulados (LOIZZO et al., 2006); entretanto, tal discordância nos achados possivelmente seja explicada pela diferença entre as abordagens metodológicas, visto que os autores anteriormente citados utilizam um procedimento de manipulação neonatal doloroso, além do fato de serem utilizadas outras espécies de animais. Assim, considerando as seguintes observações, referentes aos ratos machos manipulados, deste trabalho: peso corporal

e eficiência calórica aumentados, inalterado depósito de gordura abdominal, e diminuídos níveis de triglicérides plasmáticos, pode-se pensar que a reunião desses achados sugere uma resposta metabólica particular, no que se refere ao estoque e gasto de energia, que pode ser observada quando os animais são submetidos à uma dieta padrão, assim como quando animais machos manipulados são expostos cronicamente à uma dieta altamente calórica e palatável.

Dentre os outros indicadores bioquímicos avaliados, os níveis de colesterol total no plasma estavam aumentados nas fêmeas, porém nenhum efeito da manipulação ou da dieta foi demonstrado. Esta alteração nos níveis de colesterol identificada especialmente nas ratas fêmeas concorda com outros relatos da literatura (NEVALA et al., 2000; SLOTKIN et al., 2005), tratando-se então de uma característica sexo-específica desses animais. Além disso, os níveis de HDL-colesterol e a relação colesterol total/HDL não foram diferentes entre os grupos, sugerindo que, pelo menos neste período de tempo estabelecido para a exposição crônica, os animais que receberam a dieta palatável não demonstraram alterações desses parâmetros, as quais estariam relacionadas com possível risco cardiovascular. Por outro lado, 30 dias de exposição ao chocolate foram suficientes para causar um aumento no depósito de gordura abdominal dos animais, e esta alteração está associada, de maneira independente, com aumento no risco para síndrome metabólica e evento coronariano (CARR et al., 2004; DESPRES, 2006). Nesse sentido, pensa-se na necessidade de estudos adicionais, a fim de avaliar outras medidas indicativas de risco cardiovascular, visando contribuir para os resultados deste trabalho.

Em relação à glicemia, foi observado que as ratas fêmeas apresentavam níveis plasmáticos mais elevados em comparação com os machos; ao contrário, níveis de insulina estavam diminuídos nas fêmeas. Estes efeitos do gênero sobre a insulinemia foram previamente observados em outros estudos com ratos (COATMELLECC-TAGLIONI et al., 2003, SLOTKIN et al., 2005; SUGDEN et al., 2002), enquanto que os níveis de glicose no plasma são comumente observados serem semelhantes entre machos e fêmeas (SUGDEN et al., 2002; O'Regan et al., 2004). Em algumas abordagens de manipulação durante o período perinatal, efeitos permanentes sobre a função do eixo HPA, assim como sobre determinados fatores de risco cardiovascular foram observados serem gênero-específicos (O'REGAN et al., 2004; LIU et al., 2001), no entanto, esses achados originam-se de estudos utilizando intervenções pré-natais. Dessa forma, no presente trabalho, pode-se sugerir que os efeitos

provocados por uma intervenção pós-natal envolvendo o perfil metabólico podem também apresentar diferenças particulares entre os sexos.

## CONCLUSÃO

A manipulação neonatal aumenta o consumo de alimento palatável na vida adulta quando este tipo de alimento é oferecido durante curtos períodos de tempo; diferentemente, o mesmo efeito não é observado no momento em que esses animais são expostos cronicamente ao chocolate. No que diz respeito aos parâmetros bioquímicos, níveis mais baixos de triglicerídeos plasmáticos foram induzidos pela manipulação neonatal, bem como aumento no peso corporal e eficiência calórica. Além disso, após a exposição crônica à dieta palatável, ratas fêmeas manipuladas apresentaram reduzida gordura abdominal quando comparadas com fêmeas controles. A reunião desses resultados sugere um padrão metabólico peculiar relacionado com o gasto e estoque de energia, especialmente nos animais manipulados durante o período neonatal. Esses resultados, transportados para humanos, também sugerem uma redução no risco para síndrome metabólica. Uma vez que esses efeitos apresentam-se de maneira gênero-específica, pode ser sugerido que animais machos e fêmeas submetidos à manipulação neonatal são distintamente afetados.

Experiências precoces, mesmo que aparentemente inócuas, são capazes de determinar efeitos particulares sobre a preferência alimentar e o perfil metabólico observáveis em estágios mais avançados da vida. Tratando-se aqui de uma dieta onde os alimentos encontram-se amplamente disponíveis, pensa-se que esta preferência alimentar poderia direcionar as escolhas para determinados alimentos, o que possivelmente contribuiria para o desenvolvimento de distúrbios alimentares e, por conseguinte, alterações no padrão de saúde-doença. Assim, o melhor entendimento dos mecanismos pelos quais a manipulação neonatal pode alterar a preferência alimentar permitiria a tomada de ações preventivas ou terapêuticas

adequadas. No que se refere às particularidades do perfil metabólico, a manipulação nos primeiros 10 dias de vida parece influenciar, de modo a minimizar os potenciais efeitos deletérios do consumo crônico de uma dieta altamente calórica e palatável mais tarde na vida. Por esta razão, seria fundamental conhecer melhor os mecanismos envolvidos nesta ação protetora desempenhada pela manipulação, e assim, melhor compreender o impacto desse efeito protetor sobre a saúde a longo prazo. Estes esclarecimentos também poderiam contribuir para a otimização e a valorização dos programas de incentivo ao contato materno-infantil nas instituições de atenção a esta população em especial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ader R, Grota LJ. Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiol Behav.* 1969;4:303-5.

Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995;311:171-74.

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond).* 1998; 95:115-28.

Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol.* 2002;31:1235-39.

Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 1993;341:938-41.

Bell SJ, Sears B. Low-glycemic-load diets: impact on obesity and chronic diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43:357-77.

Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet.* 1993;341:339-41. Erratum in: *Lancet* 1993;341:572.

Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2005;54:197-203.

Branchi I, Santucci D, Alleva E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav Brain Res.* 2001;125:49-56.

Brunner EJ, Hemingway H, Walker BR, Page M, Clarke P, Juneja M, et al. Adrenocortical, autonomic, and inflammatory causes of the metabolic syndrome: nested case-control study. *Circulation.* 2002;106:2659-65.

Burdette HL, Whitaker RC, Hall WC, Daniels SR. Maternal infant-feeding style and children's adiposity at 5 years of age. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006;160:513-20.

Buse JB, Polonsky KS, Burant CF. Disorders of carbohydrate and lipid metabolism. Type 2 Diabetes Mellitus. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia: Saunders; 2003. p. 1440-1.

Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:5335-40.

Cameron NM, Champagne FA, Parent C, Fish EW, Ozaki-Kuroda K, Meaney MJ. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29:843-65.

Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2004;53:2087-94.

Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12736-41.

Charpak N, Ruiz JG, Zupan J, Cattaneo A, Figueroa Z, Tessier R, et al. Kangaroo Mother Care: 25 years after. *Acta Paediatr.* 2005;94:514-22.

Cirulli F, Berry A, Alleva E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003;27:73-82.

Coatmellec-Taglioni G, Dausse JP, Giudicelli Y, Ribiere C. Sexual dimorphism in cafeteria diet-induced hypertension is associated with gender-related difference in renal leptin receptor down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:362-7.

Da Costa LA, Canani LH, Gross JL. Síndrome metabólica. In: Gross JL, Silveiro SP et al. Rotinas Diagnósticas em Endocrinologia. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 53-6.

Dallman MF, Akana SF, Laugero KD, Gomez F, Manalo S, Bell ME, et al. A spoonful of sugar: feedback signals of energy stores and corticosterone regulate responses to chronic stress. *Physiol Behav.* 2003;79:3-12.

Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF. Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology.* 2004;145:2633-8.

Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:11696-701.

Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun.* 2005;19:275-80.

Dallman MF, Viau V, Bhatnagar S, Gomez F, Laugero K and Bell ME. Corticotropin-releasing factor (CRF), corticosteroids, stress and sugar: energy balance the brain and behavior. In: Pfaff DW, editor. *Hormones, Brain and Behavior.* San Diego: Academic Press; 2002. p. 571-631.

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;110:1258-62.

Despres JP. Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Endocrinol Invest.* 2006;29(3 Suppl):S77-82.

Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med.* 1996;334:952-7.

Duclos M, Marquez Pereira P, Barat P, Gatta B, Roger P. Increased cortisol bioavailability, abdominal obesity, and the metabolic syndrome in obese women. *Obes Res.* 2005; 13:1157-66.

Dyerberg J, Eskesen DC, Andersen PW, Astrup A, Buemann B, Christensen JH, et al. Effects of trans- and n-3 unsaturated fatty acids on cardiovascular risk markers in healthy males. An 8 weeks dietary intervention study. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1062-70.



Ely DR, Dapper V, Marasca J, Correa JB, Gamaro GD, Xavier MH, et al. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav.* 1997;61:395-8.

Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 2001;26:37-49.

Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ.* 2001;322:949-53.

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;45:342-48.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486-97. In: Athyros VG, Ganotakis ES, Elisaf MS, Liberopoulos EN, Goudevenos IA, Karagiannis A; for the GREECE-METS Collaborative Group. Prevalence of vascular disease in metabolic syndrome using three proposed definitions. *Int J Cardiol.* 2007;117:204-10.

Fagerberg B, Bondjers L, Nilsson P. Low birth weight in combination with catch-up growth predicts the occurrence of the metabolic syndrome in men at late middle age: the Atherosclerosis and Insulin Resistance study. *J Intern Med.* 2004;256:254-59.

Faith MS, Heshka S, Keller KL, Sherry B, Matz PE, Pietrobelli A, Allison DB. Maternal-child feeding patterns and child body weight: findings from a population-based sample. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2003;157:926-32.

Feldman R, Eidelman AI. Skin-to-skin contact (Kangaroo Care) accelerates autonomic and neurobehavioural maturation in preterm infants. *Dev Med Child Neurol.* 2003;45:274-81.

Ferber SG, Makhoul IR. The effect of skin-to-skin contact (kangaroo care) shortly after birth on the neurobehavioral responses of the term newborn: a randomized, controlled trial. *Pediatrics.* 2004;113:858-65.

Fewtrell MS, Doherty C, Cole TJ, Stafford M, Hales CN, Lucas A. Effects of size at birth, gestational age and early growth in preterm infants on glucose and insulin concentrations at 9-12 years. *Diabetologia.* 2000;43:714-17.

Fichter MM, Pirke KM, Pollinger J, Wolfram G, Brunner E. Disturbances in the hypothalamo-pituitary-adrenal and other neuroendocrine axes in bulimia. *Biol Psychiatry*. 1990;27:1021-37.

Follenius M, Brandenberger G, Hietter B. Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;55:757-61.

Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. 2000;133:176-82.

Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*. 1999;286:1155-8.

Freeman LM, Gil KM. Daily stress, coping, and dietary restraint in binge eating. *Int J Eat Disord*. 2004;36:204-12.

Gluckman PD, Hanson MA. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2004;9:419-25.

Goldstein DS, McEwen B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. 2002;5:55-8.

Gomes CM, Raineki C, Ramos de Paula P, Severino GS, Helena CV, Anselmo-Franci JA, et al. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol*. 2005; 184:435-45.

Gross LS, Li L, Ford ES, Liu S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:774-9.

Hanley AJ, Williams K, Stern MP, Haffner SM. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 2002;25:1177-84.

Hsueh WA, Quinones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol*. 2003;92:10-7.

Iwasaki S, Inoue K, Kiriike N, Hikiji K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol Behav*. 2000;70:551-6.

Kamara K, Eskay R, Castonguay T. High-fat diets and stress responsivity. *Physiol Behav.* 1998;64:1-6.

Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;997:150-57.

Kaye WH, Rubinow D, Gwirtsman HE, George DT, Jimerson DC, Gold PW. CSF somatostatin in anorexia nervosa and bulimia: relationship to the hypothalamic pituitary-adrenal cortical axis. *Psychoneuroendocrinology.* 1988;13:265-72.

Krousel-Wood MA, Munter P, He J, Whelton PK. Primary prevention of essential hypertension. *Med Clin North Am.* 2004;88:223-38.

Laitinen J, Pietilainen K, Wadsworth M, Sovio U, Jarvelin MR. Predictors of abdominal obesity among 31-y-old men and women born in Northern Finland in 1966. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:180-90.

Lamounier-Zepter V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Insulin resistance in hypertension and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006;20:355-67.

La Fleur SE, Akana SF, Manalo SL, Dallman MF. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology.* 2004;145:2174-85.

Law CM, Shiell AW, Newsome CA, Syddall HE, Shinebourne EA, Fayers PM, et al. Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age. *Circulation.* 2002;105:1088-92.

Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology.* 2001;142:1692-702.

Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav.* 1967;2:55-59.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997;277:1659-62.

Liu L, Li A, Matthews SG. Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:729-39.

Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:922-8 (b).

Liu S, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB, Franz M, Sampson L, et al. A prospective study of dietary glycemic load, carbohydrate intake, and risk of coronary heart disease in US women. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1455-61 (a).

Loizzo A, Loizzo S, Galietta G, Caiola S, Spampinato S, Campana G, et al. Overweight and metabolic and hormonal parameter disruption are induced in adult male mice by manipulations during lactation period. *Pediatr Res.* 2006;59:111-15.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991;156:38-50.

Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child.* 1994;71:288-90.

Maynard M, Gunnell D, Ness AR, Abraham L, Bates CJ, Blane D. What influences diet in early old age? Prospective and cross-sectional analyses of the Boyd Orr cohort. *Eur J Public Health.* 2006;16:316-24.

Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science.* 2001;294:2166-70.

McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging.* 2002;23:921-39.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999;113:97-106.

Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology.* 1989;50:597-604.

Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. *Curr Mol Med.* 2006;6:501-14.

Metcalfe NB, Monaghan P. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol Evol.* 2001;16:254-60.

Michener W, Rozin P. Pharmacological versus sensory factors in the satiation of chocolate craving. *Physiol Behav.* 1994;56:419-22.

Mikkilä V, Rasanen L, Raitakari OT, Pietinen P, Viikari J. Longitudinal changes in diet from childhood into adulthood with respect to risk of cardiovascular diseases: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1038-45.

Ness AR, Maynard M, Frankel S, Smith GD, Frobisher C, Leary SD, et al. Diet in childhood and adult cardiovascular and all cause mortality: the Boyd Orr cohort. *Heart.* 2005;91:894-8.

Nevala R, Vaskonen T, Vehniainen J, Korpela R, Vapaatalo H. Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci.* 2000;66:115-24.

Niemi LT, Suvisaari JM, Haukka JK, Lonnqvist JK. Do maternal psychotic symptoms predict offspring's psychotic disorder? Findings from the Helsinki High-Risk Study. *Psychiatry Res.* 2004;125:105-15 (b).

Niemi LT, Suvisaari JM, Haukka JK, Wrede G, Lonnqvist JK. Cumulative incidence of mental disorders among offspring of mothers with psychotic disorder. Results from the Helsinki High-Risk Study. *Br J Psychiatry.* 2004;185:11-7 (a).

O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287:863-70.

Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci.* 2001;115:1332-40.

Panagiotaropoulos T, Papaioannou A, Pondiki S, Prokopiou A, Stylianopoulou F, Gerozissis K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology.* 2004;79:109-18.

Parsons TJ, Power C, Manor O. Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. *BMJ*. 2001;323:1331-35.

Pecoraro N, Gomez F, Dallman MF. Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30:815-25.

Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*. 2004;145:3754-62.

Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, et al. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:813-22.

Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A. Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [<sup>11</sup>C] raclopride. *J Neurosci*. 2004;24:2825-31.

Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol*. 2001;38:239-51.

Real JT, Romero P, Martinez Hervas S, Pedro T, Carmena R, Ascaso JF. Role of atherogenic dyslipidemia in the development of metabolic syndrome. *Med Clin (Barc)*. 2006;127:321-4.

Remacle C, Bieswal F, Reusens B. Programming of obesity and cardiovascular disease. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28 Suppl 3:S46-53.

Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamaki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, et al. Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation*. 2004;110:3842-8.

Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res*. 1986;396:64-76.

Savino F, Liguori SA, Oggero R, Silvestro L, Miniero R. Maternal BMI and serum leptin concentration of infants in the first year of life. *Acta Paediatr*. 2006;95:414-8.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936;138:32. In: McEwen BS. *Stressed or stressed out: what is the difference?* *J Psychiatry Neurosci*. 2005;30:315-8.

Sharman MJ, Gomez AL, Kraemer WJ, Volek JS. Very low-carbohydrate and low-fat diets affect fasting lipids and postprandial lipemia differently in overweight men. *J Nutr*. 2004;134:880-5.

Singhal A, Lucas A. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet*. 2004;363:1642-45.

Silveira PP, da Silva Benetti C, Ayres C, Pederiva FQ, Portella AK, Lucion AB, Dalmaz C. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav Brain Res*. 2006;173:205-10.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav*. 2004;80:739-45.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23:93-9.

Slotkin TA, Brown KK, Seidler FJ. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. *Environ Health Perspect*. 2005;113:1291-4.

Smit JW, Romijn JA. Acute insulin resistance in myocardial ischemia: causes and consequences. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2006;10:215-9.

Soto IN, Mericq GV. Fetal growth restriction and insulin resistance. New findings and review of the literature. *Rev Med Chil*. 2005;133:97-104.

Sugden MC, Holness MJ. Gender-specific programming of insulin secretion and action. *J Endocrinol*. 2002;175:757-67.

Syddall HE, Sayer AA, Simmonds SJ, Osmond C, Cox V, Dennison EM, et al. Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study. *Am J Epidemiol*. 2005;161:1074-80.

Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD, Meaney MJ. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol*. 1997;273:1168-77.

Tavani A, Giordano L, Gallus S, Talamini R, Franceschi S, Giacosa A, et al. Consumption of sweet foods and breast cancer risk in Italy. *Ann Oncol*. 2006;17:341-5.

Tucker KL, Hallfrisch J, Qiao N, Muller D, Andres R, Fleg JL; Baltimore Longitudinal Study of Aging. The combination of high fruit and vegetable and low saturated fat intakes is more protective against mortality in aging men than is either alone: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Nutr*. 2005;135:556-61.

Utzschneider KM, Carr DB, Hull RL, Kodama K, Shofer JB, Retzlaff BM, et al. Impact of intra-abdominal fat and age on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes*. 2004;53:2867-72.

Walker CD, Sapolsky RM, Meaney MJ, Vale WW, Rivier CL. Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. *Endocrinology*. 1986;119:1816-21.

Weingarten HP, Elston D. The phenomenology of food cravings. *Appetite*. 1990;15:231-46.

Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res*. 1975;9:154-56.

Wright CM, Parkinson KN, Drewett RF. How does maternal and child feeding behavior relate to weight gain and failure to thrive? Data from a prospective birth cohort. *Pediatrics*. 2006;117:1262-9 (a).

Wright CM, Parkinson KN, Drewett RF. The influence of maternal socioeconomic and emotional factors on infant weight gain and weight faltering (failure to thrive): data from a prospective birth cohort. *Arch Dis Child*. 2006;91:312-7 (b).

Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*. 2003;68:439-45.

Young JB. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:R1745-52.



Zhang TY, Bagot R, Parent C, Nesbitt C, Bredy TW, Caldji C, et al. Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. *Biol Psychol.* 2006;73:72-89.