

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

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES
NEUROBIOLÓGICAS EM ROEDORES MACHOS
SUBMETIDOS AO TRAUMA PRECOCE, MEDIADAS
PELO CONSUMO CRÔNICO DE “*COMFORT-FOOD*”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA CARLA DE ARAÚJO DA CUNHA

Porto Alegre, Brasil 2018

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

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES
NEUROBIOLÓGICAS EM ROEDORES MACHOS
SUBMETIDOS AO TRAUMA PRECOCE, MEDIADAS
PELO CONSUMO CRÔNICO DE “*COMFORT-FOOD*”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA CARLA DE ARAÚJO DA CUNHA

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Ursula Silveira Matte
Coorientadora: Dra. Tania Diniz Machado
Colaboradora: Profa. Dra. Patricia Pelufo Silveira

Porto Alegre, Brasil 2018

CIP - Catalogação na Publicação

de Araújo Cunha, Ana Carla

Investigação das alterações neurobiológicas em animais submetidos ao trauma precoce, mediados pelo consumo de "comfort-food" / Ana Carla de Araújo Cunha. -- 2018.

70 f.

Orientadora: Ursula Silveira Matte.

Coorientadora: Tania Diniz Machado.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Estresse. 2. Ansiedade. 3. Comportamento Alimentar. I. Silveira Matte, Ursula, orient. II. Diniz Machado, Tania, coorient. III. Título.

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

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

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

05/10/2018

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof^a. Dr. Daniela Laurenó Pereira
Fundação Universitária de Cardiologia

Dra. Carine Lampert
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr. Juliana Rombaldi Bernardi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que mudou e tem mudado a minha vida, me dando forças para vencer todas as dificuldades e a minha mãe que muito me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele nos dá o dom da vida, todos os dias, e nos sustenta com a suas fortes mãos para alcançarmos nossos sonhos.

A presente dissertação não poderia chegar ao término sem o amparo da minha co-orientadora Dr^a.Tania Diniz Machado que sempre disposta esteve ao meu lado, que acreditou em mim, mesmo quando eu não acreditava ser capaz de responder. Sempre disposta a ajudar, você não foi apenas co-orientadora, mas, em alguns momentos, conselheira, confidente e amiga. Um referencial de profissional para mim. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar em mim!

Agradeço a professora Patrícia Pelufo Silveira, pelo exemplo e inspiração, demonstrando grandiosamente sabedoria e humildade. Agradeço por me acolher e confiar em mim, mesmo partindo para outra instituição de ensino.

Desejo igualmente agradecer a professora Ursula Matte, por me aceitar como aluna e, dessa forma, permitir a continuidade do meu mestrado. Cordial, se fez disponível sempre que necessitei.

Estendo meus agradecimentos a todo o grupo Dohad, especialmente a Dr^a Roberta Dalle Molle, Dr^a Daniela Pereira Laureano e a Dr^a Amanda Mucelline, que participaram ativamente desse trabalho. Obrigada pela ajuda!

Finalmente agradeço ao pequeno Calebe, que nasceu durante esse trabalho e esteve tão presente no desenvolvimento dele.

RESUMO

Introdução: O estresse na vida adulta está associado ao desenvolvimento de ansiedade e preferência por alimento do tipo “*comfort-food*” (alimento rico em gordura e/ou açúcar). É proposto que o consumo desse tipo de alimento seja capaz de inibir os sintomas de ansiedade via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) reduzindo os níveis de corticosterona, sendo utilizado como “automedicação”. No entanto, os efeitos a longo prazo do trauma no início da vida sobre estes desfechos de consumo alimentar e comportamentais são menos conhecidos. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi verificar se uma dieta “*comfort-food*” é capaz de modificar o comportamento e desfechos neurobiológicos em animais submetidos ao trauma precoce. **Métodos:** A partir do segundo dia de vida, ninhadas de ratos Wistar e suas genitoras foram submetidas à redução de material para confeccionar o ninho (intervenção). Na vida adulta, os animais foram submetidos a uma dieta do tipo “*comfort-food*”, contendo gordura (34%) e açúcar (20%). O ganho peso dos animais e o consumo alimentar foi acompanhado semanalmente. A ansiedade foi mensurada usando o teste de labirinto em cruz elevado. A resposta neuroendócrina a 20 minutos de estresse por contenção foi verificada pela mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona imediatamente, 20, 40 e 70 minutos após o fim do estresse. Níveis de leptina, HDL, colesterol total, triglicerídeos, T3, T4 e glicose foram avaliados no plasma. Além disso, os níveis de GR (no hipocampo), SOCS-3 e pSTAT3 (no hipotálamo) foram analisados. O percentual de gordura abdominal foi mensurado. Um grupo controle histórico, gerado e mantido nas mesmas condições e mesma Unidade de Experimentação acompanhado previamente à este estudo foi usado para comparação. Este grupo seguiu o mesmo protocolo de trauma neonatal e consumiu dieta padrão do ratário. **Resultados:** As genitoras do grupo intervenção apresentaram uma menor média de LG comparadas às controles ($p=0,020$). Os animais ganharam peso de maneira similar ao longo do estudo, antes ($p=0,945$) e após a exposição a dieta “*comfort-food*” ($p=0,097$). Não houve diferenças entre os grupos quanto a preferência alimentar por “*comfort-food*” ($p=0,738$). Supreendentemente, o grupo controle quando exposto a dieta “*comfort-food*” apresentou comportamento do tipo ansioso demonstrado por menor tempo no braço aberto ($p=0,011$) e menor frequência entrada no braço aberto ($p=0,040$). No teste de resposta neuroendócrina ao estresse os grupos expostos a dieta “*comfort-food*” apresentaram menores níveis de corticosterona ao longo do tempo independente do grupo neonatal ($p<0,0001$). Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto aos níveis de leptina ($p=0,588$), HDL ($p=0,235$), colesterol total ($p=0,910$), triglicerídeos ($p=0,8393$), T3 ($p=0,355$), T4 ($p=0,156$) e pSTAT ($p=0,142$). O grupo intervenção exposto à dieta “*comfort-food*” apresentou maiores níveis de GR no hipocampo ($p=0,004$), menores níveis de SOCS-3 no hipotálamo ($p=0,035$) e maior acúmulo de gordura abdominal ($p=0,017$). **Conclusão:** O consumo crônico de dieta do tipo “*comfort-food*” é capaz de reduzir os níveis hormonais de corticosterona independente da história neonatal de trauma vivenciada. Cronicamente a exposição a essa dieta pode induzir a ansiedade em animais sem história prévia de trauma. O menor nível de SOCS-3 no hipotálamo, sem diferença nos níveis de leptina e o acúmulo de gordura abdominal no grupo intervenção sugerem uma possível resistência a leptina.

Palavras-chave: Estresse, ansiedade, comportamento alimentar.

ABSTRACT

Introduction: Stress in adulthood is associated with the development of anxiety and preference for “comfort-foods” (foods that are rich in fat and/or sugar). It is proposed that the consumption of this type of food is able to inhibit anxiety symptoms by the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, reducing corticosterone levels and being used as "self-medication". However, the long-term effects of early-life trauma on these eating and behavioral outcomes are less well known. **Objective:** The objective of this study was to verify if a "comfort-food" diet is able to modify behavior and neurobiological outcomes in animals submitted to early trauma. **Methods:** From the second day of life, litter of Wistar rats and their mothers were submitted to the reduction of material to make the nest (intervention). In adult life, the animals were submitted to a “comfort-food” diet, containing fat (34%) and sugar (20%). Animal weight gain and food consumption were monitored weekly. Anxiety was measured using the plus maze apparatus. The neuroendocrine response of 20 minutes of contention stress was verified by measuring plasma corticosterone levels immediately, 20, 40 and 70 minutes after the end of stress. Levels of leptin, HDL, total cholesterol, triglycerides, T3, T4 and glucose were evaluated in plasma. In addition, levels of GR (in the hippocampus), SOCS-3 and pSTAT3 (in the hypothalamus) were analyzed. The percentage of abdominal fat was measured. A historical control group, generated and maintained under the same conditions and same Unit of Experimentation followed before this study was used for comparison. This group followed the same neonatal trauma protocol and consumed the standard diet of the rat. **Results:** The dams of the intervention group had a lower LG mean compared to controls ($p = 0.020$). The animals gained weight similarly throughout the study, before ($p = 0.945$) and after exposure to a “comfort-food” diet ($p = 0.097$). There were no differences between the groups regarding the “comfort-food” preference ($p = 0.738$). Surprisingly, the control group when exposed to the “comfort-food” diet showed an anxious behavior demonstrated by a shorter time in the open arm ($p = 0.011$) and a lower frequency of open arm ($p = 0.040$). In the neuroendocrine stress response test, the groups exposed to the “comfort-food” diet had lower levels of corticosterone over time independent of the neonatal group ($p < 0.0001$). There were no statistically significant differences in the levels of leptin ($p = 0.588$), HDL ($p = 0.235$), total cholesterol ($p = 0.910$), triglycerides ($p = 0.8393$), T3 ($p = 0.156$) and pSTAT ($p = 0.142$). The intervention group exposed to the “comfort-food” diet had higher levels of GR in the hippocampus ($p = 0.004$), lower levels of SOCS-3 in the hypothalamus ($p = 0.035$) and greater accumulation of abdominal fat ($p = 0.017$). **Conclusions:** Chronic “comfort-food” diet consumption is able to reduce hormone levels of corticosterone independent of the neonatal history of trauma experienced. Chronically exposure to this diet can induce anxiety in animals without previous history of trauma. The lower level of SOCS-3 in the hypothalamus, with no difference in leptin levels and the accumulation of abdominal fat in the intervention group suggest a possible leptin resistance.

Keywords: Stress, anxiety, feeding behavior

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema mostrando a distribuição das ninhadas nos diferentes experimentos realizados.....	30
Figura 2 - Esquema mostrando a distribuição entre os grupos.....	31
Figura 3 - Desenho experimental.....	31
Figura 4 - Grupo controle neonatal. Fonte: Machado 2012.	32
Figura 5 - Grupo intervenção neonatal. Fonte: Machado 2012.....	32
Figura 6 -Peso corporal, ao longo de 6 semanas, após o desmame nos grupos controle e intervenção.....	41
Figura 7-Peso corporal, ao longo de 7 semanas de dieta nos grupos controle e intervenção...42	
Figura 8- Consumo de ração do tipo “comfort-food” ao longo de 7 semanas pelos grupos controle e intervenção.....	43
Figura 9 - Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimentos nos 4 grupos	46
Figura 10- Conteúdo de receptores de glicocorticoide no hipocampo dos grupos controle e intervenção com o consumo de dieta padrão.....	47
Figura 11– Conteúdo de receptores de glicocorticóides no hipocampo dos grupos controle e intervenção que receberam a dieta “comfort-food”	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de gordura abdominal nos machos, conforme grupo neonatal.....	44
Tabela 2 – Resultados das análises de HDL, colesterol total, glicose, triglicerídeos, glicose, T4 e T3 conforme o grupo neonatal.....	44
Tabela 3 – Análises bioquímicas: medidas centrais no hipotálamo e leptina plasmática.	45
Tabela 4 – Variáveis analisadas no labirinto em cruz elevado, conforme a dietas comparando os grupos.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CEUA	Comissão de Ética de Uso Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRH	Hormônio liberador corticotrofina
CT	Colesterol total
DOHaD	Origens Desevolvementistas da Saúde e da doença no adulto
GR	Receptores glicocorticóides
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
JAK2	Janus quinase do tipo 2
LG	<i>Licking and grooming</i> – lambar os filhotes
PIAS	Proteína inibidora da STAT ativada
PSTAT	Fosfo- STAT
PSTAT3	Fosfo- STAT do tipo 3

PTPs	Proteína tirosina fosfatase
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
Rpm	Rotações por minuto
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório
SOCS	Supressor de sinalização de citocina
SOCS-3	Supressor de sinalização de citocina do tipo 3
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
UEA	Unidade de Experimentação Animal
5-HT	Serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA).....	16
2.2 ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA.....	17
2.3 ANSIEDADE	19
2.4 ALIMENTOS CONFORTANTES OU “COMFORT- FOOD”	20
2.5 LEPTINA	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. HIPÓTESE	28
6. METODOLOGIA	29
6.1 ANIMAIS.....	29
6.1.1 Grupos Neonatais	31
6.1.2 Observações do cuidado materno	33
6.1.3 Avaliação do ganho de peso corporal	34
6.1.4 Subdivisão dos grupos neonatais em diferentes dietas.....	34
6.1.5 Teste do labirinto em cruz elevado	35
6.1.6 Estresse por contenção de movimento	36
6.1.7 Coleta de material biológico	36
6.1.8 Análise Bioquímicas Periféricas.....	37
6.1.9 Medidas centrais	37
6.1.10 Western blotting	37
7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
7.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
8. RESULTADOS	40

8.1	GRUPO CONTROLE E INTERVENÇÃO.....	40
8.1.1	Cuidado materno	40
8.1.2	Peso corporal ao longo das primeiras 6 semanas após o desmame.....	40
8.1.3	Peso Corporal ao longo de 7 semanas de dieta	41
8.1.4	Percentual de dieta palatável consumida ao longo de 7 semanas	42
8.1.5	Gordura abdominal.....	43
8.1.6	Análises bioquímicas	44
8.1.7	Teste labirinto em cruz elevado entre os quatro grupos.....	45
8.1.8	Curva de corticosterona em resposta ao estresse entre os quatros grupos..	46
8.1.9	Conteúdo de glicocorticoides no hipocampo	47
9.	DISCUSSÃO.....	48
10.	CONCLUSÃO.....	61
11.	REFERÊNCIAS	62
11.	INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO SUBMETIDO	70

1. INTRODUÇÃO

O estresse é uma perturbação da homeostasia, ou percepção de ameaça, que ativa uma resposta integrada de múltiplos mecanismos para que o organismo consiga lidar com os estressores e devolver o reequilíbrio e a sensação de bem estar (DARNAUDERY e MACCARI, 2008; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). Dessa forma, o organismo reage ao estresse através de ajustes neuroquímicos, metabólicos, e comportamentais visando reestabelecer seu equilíbrio (CANNON, 1913).

Para entender melhor as situações de abuso e negligência em períodos cruciais no desenvolvimento (o que é considerado um estresse) é utilizado um modelo animal no qual o material disponível para construir o ninho é reduzido. Neste modelo a genitora está presente, porém apresenta alterações do comportamento materno em relação à prole, devido a precariedade do material disponível para a confecção do ninho. Isso prejudica a relação mãe-filhote e resulta em menor frequência no ato de lambar os filhotes (*licking and grooming- LG*) (IVY *et al.*, 2008), o que ocasiona alterações do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) dos filhotes (AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001; BRUNSON *et al.*, 2005; RICE *et al.*, 2008). Esta alteração, por sua vez, culmina em maiores níveis de corticosterona (um dos hormônios do estresse), quando esses animais são submetidos ao estresse crônico, e leva ao desenvolvimento de comportamento do tipo ansioso (DALLE MOLLE *ET AL.*, 2012; MACHADO, DALLE MOLLE, *et al.*, 2013).

Em ratos, o estresse crônico (e conseqüentemente altas concentrações de glicocorticoides), combinado com a ingestão unicamente de ração padrão, leva à diminuição do peso corporal. No entanto, com a disponibilização de “*comfort-foods*” (alimentos ricos em gorduras e/ou açúcares), ocorre o aumento do consumo desse tipo de alimento, como forma de reduzir a resposta ao estresse e conseqüente aumento do peso corporal (DALLMAN *et al.*,

2003). Com a ativação exacerbada do eixo HPA, os glicocorticóides podem levar a desfechos tais como: obesidade abdominal, diabetes tipo II, aumento da morbidade e mortalidade (DALLMAN, LA FLEUR, *et al.*, 2004).

No estresse crônico alterações no eixo HPA modificam a resposta ao estresse, alterando a sensibilidade central aos glicocorticóides (DALLMAN *et al.*, 2005; MORRIS *et al.*, 2014). Dallman e colaboradores propuseram a teoria que o consumo de alimento do tipo “*comfort-food*” seria uma forma de inibir o eixo HPA levando a uma diminuição de cortisol/corticosterona. À medida que ocorre o consumo de alimento palatável de forma crônica existe o acúmulo de gordura abdominal e a partir dessa gordura sinais seriam emitidos ao hipocampo (região repleta de receptores de glicocorticóides) para que ocorra um *feedback* negativo na tentativa de inibir o eixo e diminuir o estresse percebido pelo organismo (DALLMAN, AKANA, *et al.*, 2004). Por mecanismos ainda não elucidados sugere-se que o consumo de dieta palatável em períodos de estresse cause uma sensação de bem-estar, com redução de respostas neuroendócrinas e comportamentais ao estresse. Danese e colaboradores (2014) encontraram uma relação entre estresse e redução na resposta a leptina. Seus resultados mostram que crianças expostas a maus tratos apresentaram menores níveis séricos de leptina em relação ao tecido adiposo corporal, indicando uma deficiência deste hormônio (DANESE *et al.*, 2014). A leptina atua no comportamento alimentar, inibindo a ingestão alimentar e seus níveis séricos são proporcionais à quantidade de tecido adiposo corporal. Estudos indicam que os glicocorticóides e a insulina aumentam a secreção dos níveis de leptina através do aumento da expressão de leptina no tecido adiposo (FRIED *et al.*, 2000; PRATLEY *et al.*, 2000). Além disso, o aumento no tecido adiposo, e a ação dos glicocorticóides sobre o metabolismo, leva à resistência a insulina. Desse modo, a redução nas sinalizações dos glicocorticóides a nível central poderia levar à redução dos estímulos dos glicocorticóides sobre a secreção de leptina, aumentando a hiperfagia (DANESE *et al.*, 2014).

O uso de dietas ricas em gorduras e açúcares (hiperlipídica e hipersacarídica) podem levar à hiperleptinemia causando dessensibilização dos receptores de leptina e resistência à leptina (MATHENY *et al.*, 2011). Uma das cascatas de reações ativadas da leptina é a JAK2/STAT3 (ZABEAU *et al.*, 2003). Após uma série de reações e autofosforilações (TARTAGLIA, 1997) o sítio JAK2/STAT3 é responsável por conduzir o sinal de leptina ao núcleo coordenando a transcrição de genes responsivos ao sinal hormonal (BJORBAEK E KAHN, 2004). Existem três classes de reguladores inibitórios de JAK2/STAT3 (RAWLINGS *et al.*, 2004), SOCS (supressor de sinalização de citocina), PIAS (proteína inibitória da STAT ativada) e PTPs (proteína tirosina fosfatase). Portanto, a mensuração da atividade desses reguladores nos permite inferir como está a sinalização intracelular da leptina.

Animais que vivenciaram trauma precoce por sete dias (modelo de redução de maravalha) apresentaram preferência por alimento palatável quando comparados a animais controles (MACHADO, MOLLE, *et al.*, 2013). Esse resultado vai ao encontro de outro modelo bastante utilizado na literatura, de manipulação neonatal, onde animais manipulados apresentam preferência pelo alimento palatável (SILVEIRA *et al.*, 2010).

Sabendo que a preferência alimentar pode ser programada no período precoce da vida, influenciando mais tarde a escolha alimentar, e que a escolha de alimentos não saudáveis pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, é importante entender a relação entre trauma precoce, consumo de alimento palatável e o desenvolvimento de ansiedade. Além disso, torna-se interessante investigar os mecanismos pelos quais ocorre a alteração do comportamento alimentar com preferência por alimentos palatáveis e sua associação com a redução das respostas endócrinas após exposição ao estresse crônico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HPA) é necessária para a adaptação ao estresse levando à secreção de glicocorticóides, que atuam em múltiplos sistemas de órgãos, para redirecionar recursos energéticos e atender à demanda real ou antecipada de uma situação de estresse (HERMAN *et al.*, 2016). O restabelecimento da homeostase requer a ativação coordenada do sistema neuroendócrino e autônomo (ULRICH-LAI E HERMAN, 2009).

Numa resposta imediata à ameaça o sistema simpático é ativado, culminando com a liberação de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea (HABIB *et al.*, 2001). Além disso, glicocorticóides, os subprodutos gerados pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) no córtex da adrenal (HABIB *et al.*, 2001), são liberados e agem sobre múltiplos locais periféricos e centrais. Quando há o estímulo ameaçador existe a produção de hormônio liberador de corticotrófica (CRH) no núcleo para ventricular do hipotálamo (PVN). São produzidos movimentos excita tórios ou inibitórios dos neurônios ali localizados que enviam sinais para glândula pituitária (HERMAN *et al.*, 2003). Esses sinais estimulam a liberação de adrenocorticotrofina (ACTH) na corrente sanguínea responsável por estimular a liberação de glicocorticoides pelo córtex da adrenal (HERMAN E CULLINAN, 1997). A desregulação da resposta ao estresse pode ser prejudicial para várias funções do organismo, estando associada a disfunções metabólicas, imunológicas e psiquiátricas.

A capacidade do indivíduo em resistir a alterações causadas pelos efeitos do estresse é chamada de resiliência. A resiliência se caracteriza por um processo adaptativo mediado por alterações em circuitos neurais para que ocorra uma resposta bem-sucedida ao estresse (HAN *et al.*, 2017). Estudos consideram que possa existir um fator genético associado à resiliência, e, portanto à capacidade do eixo HPA em responder dentro dos limites adequados (HAN *et al.*, 2017). A expressão e a translocação dos receptores de glicocorticoides (GR) no hipocampo tem

papel importante no desenvolvimento da resiliência ao estresse. É vista maior expressão de receptores de GR no hipocampo e menor ativação do eixo HPA em roedores que são resilientes aos efeitos de derrota social quando comparados com os roedores susceptíveis (HAN *et al.*, 2017).

As regiões límbicas trabalham simultaneamente para influenciar a ativação do eixo HPA e provavelmente desempenham funções semelhantes nas respostas autonômicas ao estresse. Embora o GR esteja difundido pelo sistema límbico e envolvido no processo de respostas emocionais ao estresse, o sistema límbico tem pouca interação direta com os sistemas efetores primários do estresse (ULRICH-LAI E HERMAN, 2009). Os glicocorticóides como produto resultante da ativação do eixo HPA interagem com GR expressa no hipocampo e hipotálamo. De forma semelhante ao que ocorre no hipotálamo, o GR no hipocampo medeia o *feedback* negativo do eixo HPA. Algumas drogas antidepressivas demonstram ser eficazes na redução de glicocorticóides por aumentarem a expressão de GR no hipocampo (HAN *et al.*, 2017). Durante a resposta ao estresse ocorre à liberação de glicocorticóides que se ligam aos receptores de GR para ativar o *feedback* negativo e diminuir a atividade do eixo, todavia a ocupação crônica de GR pode prejudicar o processo de *feedback* mediado pelo hipocampo resultando em ativação mais prolongada do eixo HPA a eventos estressantes (TOTTENHAM e SHERIDAN, 2009).

2.2 ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA

Estudos indicam que as exposições precoces a experiências adversas têm impacto sobre as respostas comportamentais e neuroendócrinas e está fortemente associada a desordens mentais na vida adulta, tais como transtornos de ansiedade e depressão (KAUFMAN *et al.*, 2000; PLOTSKY *et al.*, 2005; DARNAUDERY e MACCARI, 2008; MCLAUGHLIN *et al.*, 2010). Porém sabe-se que nem todos os indivíduos que passam por estresse no início da vida desenvolvem psicopatologias (PAPALE *et al.*, 2017). Essa associação pode ser mediada pela

ativação alterada do eixo HPA. Diferentes estressores podem sensibilizar os sistemas de resposta ao estresse na infância, culminando com a ação do cortisol (KUHLMAN *et al.*, 2015) que exerce seus efeitos sobre o cérebro e a periferia.

Quando o estresse ocorre no início da vida, que representa um estágio crítico do desenvolvimento em que o cérebro está vulnerável, seu impacto na função cerebral pode ser duradouro ou permanente, diferente dos efeitos transitórios do estresse no cérebro adulto (MOLET *et al.*, 2014). As regiões neurais exibem plasticidade e, portanto, susceptibilidade a influências ambientais em momentos diferentes do desenvolvimento, com durações diversas (MORICEAU *et al.*, 2009).

A percepção de ter recebido um cuidado materno de baixa qualidade ao longo do desenvolvimento pode ser considerada um estressor em seres humanos (MCLAUGHLIN *et al.*, 2015). Nos animais, observa-se que em roedores existe uma variação natural do cuidado materno, expresso através do ato da genitora lambem seus filhotes (LIU *et al.*, 1997). Filhotes adultos de mães de alta frequência de lambidas (bom cuidado materno) demonstram uma redução na duração de secreção de corticosterona plasmática em resposta ao estresse, em comparação com filhotes expostos ao cuidado materno de pior qualidade (LIU *et al.*, 1997). A prole também apresenta redução na expressão de CRH e aumento da expressão de GR no hipocampo (LIU *et al.*, 1997). Assim, quanto maior a frequência de lambidas, menor a resposta HPA ao estresse na vida adulta (LIU *et al.*, 1997). Em outras palavras, o cuidado materno de alta qualidade se reflete em uma resposta ao estresse menos duradoura na vida adulta (LIU *et al.*, 1997).

Na tentativa de mimetizar situação de abuso e negligência é utilizado na literatura um modelo neonatal de redução de Mara valha (material que a genitora utiliza para confecção do ninho). Os filhotes expostos a este modelo exibem maiores níveis de comportamento tipo

ansioso, parecem ter preferência por “*comfort-food*” e maiores níveis de corticosterona em resposta ao estresse na vida adulta (IVY *et al.*, 2008; MACHADO, MOLLE, *et al.*, 2013).

2.3 ANSIEDADE

A ansiedade é um estado emocional, caracterizado por resposta generalizada a uma ameaça desconhecida ou um conflito interno. Mudanças fisiológicas e comportamentais, com alterações autonômicas, através da ativação simpática, e neuroendócrina, com ativação do eixo HPA, resultam em um fenótipo ansioso (STEIMER, 2002; 2011).

Eventos traumáticos, principalmente nos primeiros anos de vida, podem levar a transtornos de ansiedade e depressão. Em roedores, cuidados maternos variáveis e imprevisíveis resultam em comportamentos do tipo ansioso na prole (BARAM *et al.*, 2012). Evidências têm demonstrado que indivíduos que passaram por maus tratos e outros traumas durante a infância, na idade adulta, apresentam transtornos de humor, ansiedade e resposta emocional elevada para eventos diários (MCLAUGHLIN *et al.*, 2010). Em roedores, o estresse no início da vida leva a comportamento de ansiedade, depressão e dificuldades de aprendizado na vida adulta (SHIKANAI *et al.*, 2013; CLINTON *et al.*, 2014). Um mecanismo pelo qual a adversidade precoce promove hiperativação do eixo HPA e reatividade ao estresse é através do desenvolvimento de um viés atencional a estímulos ameaçadores, observado nos indivíduos com transtornos de ansiedade (NOLTE *et al.*, 2011).

Os transtornos mentais estão relacionados com altos custos de saúde (BANDELOW e MICHAELIS, 2015) levando a má qualidade de vida (GARIEPY *et al.*, 2010), depressão (NOLTE *et al.*, 2011) e mortalidade (GARIEPY *et al.*, 2010). Pesquisas populacionais demonstram que até 33,7% da população é afetada por um transtorno de ansiedade durante sua vida. Esses transtornos de ansiedade podem ser: transtorno do pânico com ou sem fobia,

transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social, fobias específicas e transtorno de ansiedade de separação (BANDELOW e MICHAELIS, 2015).

Estudos experimentais auxiliam no entendimento do transtorno do tipo ansioso. Fêmeas apresentam níveis elevados de corticosterona, após teste de estresse por contenção de movimentos, comparadas aos ratos machos. Essa variação sexo específica também é observada quanto ao fenótipo ansioso (DALLE MOLLE, 2011). O perfil das respostas agudas e comportamentais pode ser explicado pela interação do hormônio corticotropina, liberado durante o estresse com o sistema de serotonina que é modulado pelos hormônios sexuais (MCEUEN *et al.*, 2009). Além disso, uma desregulação das vias de estresse produz alterações nas respostas comportamentais e fisiológicas mediadas por 5-HT durante o estresse (MCEUEN *et al.*, 2009). Existem diferenças entre os sexos quanto à susceptibilidade a desenvolver doenças mentais relacionadas ao estresse. As mulheres apresentam maior incidência para transtornos de ansiedade e são duas vezes mais propensas a sofrer depressão, em relação aos homens (FARRELL *et al.*, 2013). Essa susceptibilidade, dependente de sexo, pode estar relacionada às diferenças fisiológicas e neurológicas entre os sexos que são importantes para a capacidade de resposta ao estresse e ansiedade (DONNER e LOWRY, 2013).

2.4 ALIMENTOS CONFORTANTES OU “COMFORT- FOOD”

A atenuação do comportamento do tipo ansioso é visto em ratos expostos a uma dieta do tipo “*comfort-food*” após submissão de um protocolo de estresse na vida adulta (PRASAD e PRASAD, 1996; PECORARO *et al.*, 2004; TOMIYAMA *et al.*, 2011). Alimentos tipo “*comfort-food*” são alimentos palatáveis, densos em energia e ricos em açúcar e gordura. São considerados gratificantes e consumidos como medida de conforto para aliviar sintomas de estresse (PECORARO *et al.*, 2004; DALLMAN, 2010).

A co-morbidade entre estresse psicológico, comportamento alimentar alterado e obesidade originou vários estudos demonstrando que o consumo de alimentos, principalmente os do tipo “*comfort-food*”, aumentam concomitante com a percepção do estresse e, estão associados ao acúmulo de gordura visceral em seres humanos (ALVAREZ *et al.*, 2007; D'ARGENIO *et al.*, 2009).

Mulheres altamente estressadas relatam comer mais em resposta ao estresse, além disso, apresentam maior IMC e gordura abdominal e menor resposta do eixo HPA frente a estresse agudo comparado ao seu grupo de controle (TOMIYAMA *et al.*, 2011). Mulheres expostas ao estresse crônico têm aumento na ingestão calórica logo após situação de estresse. Aquelas mais reativas ao estresse (maior secreção de cortisol) apresentam preferência por alimentos doces quando comparadas às mulheres com baixa reatividade ao estresse (EPEL *et al.*, 2001). Em roedores, o estresse crônico promove aumento na ingestão de alimentos palatáveis (PECORARO *et al.*, 2004). Esses dados também são suportados por estudos com primatas não humanos, em que fêmeas sob estresse crônico de subordinação consomem mais alimentos ricos em açúcar e gordura comparadas às fêmeas dominantes (WILSON *et al.*, 2008).

Interessantemente é visto que o cortisol pode influenciar o consumo alimentar mesmo na ausência de estresse psicológico. Em humanos após administração de CRH, que provoca uma liberação aumentada de cortisol, há um aumento significativo da ingestão de alimentos comparado ao grupo placebo. Isto sugere que o próprio cortisol pode estimular diretamente o consumo de alimentos (GEORGE *et al.*, 2010). Em roedores, o consumo de dieta palatável aumenta conforme os níveis de corticosterona administrados a ratos adrenalectomizados, de forma dose dependente (DALMAN 2005). Assim, os glicocorticóides podem estimular diretamente o consumo de alimentos em seres humanos e roedores. Buwalda e colaboradores, a fim de avaliar se uma dieta rica em gordura afetava as respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse, expuseram roedores a estresse psicossocial e imunológico.

Observaram que os animais reduzem as respostas comportamentais e fisiológicas após o consumo crônico de dieta rica em gordura por três meses (BUWALDA *et al.*, 2001).

Alimentos “*comfort-food*” consumidos cronicamente podem reduzir a atividade do eixo hipotálamo hipófise adrenal. Roedores machos expostos ao estresse crônico apresentam maior preferência por alimentos confortantes e uma redução de ACTH e da expressão de CRH após três meses de acesso a alimentos palatáveis quando comparados com roedores que tiveram acesso somente a ração padrão (PECORARO *et al.*, 2004). Roedores alimentados com uma solução palatável rica em sacarose apresentam atenuação das respostas dos eixos HPA ao estresse agudo, com redução significativa da secreção de ACTH e corticosterona (ULRICH-LAI *et al.*, 2010). Os resultados do estudo também mostram que pequenas quantidades de alimento já seriam suficientes para desacelerar o eixo HPA em resposta a um estresse agudo. Além disso, as respostas nos níveis de ACTH diminuem após o consumo de sacarina sugerindo que as propriedades gratificantes seriam suficientes para controlar as respostas do eixo HPA em resposta a estresse agudo (ULRICH-LAI *et al.*, 2010).

Durante o período de estresse, níveis elevados de glicocorticóides promovem mudanças metabólicas que levam à utilização de reservas energéticas, além de estimular a secreção de insulina, favorecendo a redistribuição das reservas corporais de energia, (DALLMAN *et al.*, 2003) e promovendo a adiposidade abdominal (DALLMAN, 2010). Dessa forma, a secreção dos glicocorticóides, além da influência sobre o consumo de alimentos densos em energia, promove a deposição de gordura visceral (ADAM e EPEL, 2007). Roedores que apresentam respostas crônicas ao estresse, após consumo de dieta rica em açúcar e gordura demonstram maior deposição gordura mesentérica e menor expressão de CRH no núcleo paraventricular, além de menores níveis de corticosterona (TOMIYAMA *et al.*, 2011).

A preferência por alimentos confortantes independe do apetite e da ingestão total de calorias (SILVEIRA *et al.*, 2006; DALLMAN, 2010) sendo o consumo percebido como forma

de alívio da resposta ao estresse, o que reforça o comportamento alimentar (DALLMAN, 2010). Além disso, a ingestão destes alimentos confere sensações prazerosas (SILVEIRA *et al.*, 2006) promovendo o consumo além das exigências homeostáticas. Isso explica por que alguns cientistas sugerem que o consumo aumentado dos alimentos palatáveis é semelhante ao comportamento de toxicodependência (MURRAY *et al.*, 2014; COLMAN *et al.*, 2015).

Embora os dados da literatura demonstrem um aumento no consumo de alimentos ricos em gordura e açúcar em períodos de estresse na vida adulta, pouco se conhece sobre o impacto do consumo alimentar sobre o desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso relacionado à exposição ao estresse no início da vida.

2.5 LEPTINA

A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos (KELESIDIS e MANTZOROS, 2006) com papel importante na regulação do apetite, balanço energético e imunidade sendo que muitos indivíduos obesos apresentam resistência a esse hormônio apresentando um aumento nos níveis sanguíneos do mesmo (LUBIS *et al.*, 2008). Um dos mecanismos considerados relacionados à resistência à leptina é a interrupção do processo de transdução de sinal através da JAK2-STAT3 e a Supressor de sinalização de citocina do tipo 3 (SOCS-3) (LUBIS *et al.*, 2008). A SOCS-3 é uma proteína que inibe a transdução de sinal processo de várias citocinas no organismo, incluindo a leptina (LUBIS *et al.*, 2008). A expressão de SOCS-3 é induzida por leptina e a ativação da SOCS-3 inibe a fosforilação de STAT3, que é importante na transmissão do sinal nos receptores de leptina. Essa inibição irá consequentemente causar resistência à leptina caracterizada por disfunção da função biológica da leptina.

Quando a leptina é secretada ocorre o estímulo dos neurônios hipotalâmicos, induzindo a regulação negativa do neuropeptídeo Y e o aumento da regulação do hormônio estimulante dos melanócitos alfa, inibindo a liberação de dopamina mesolímbica e ativando o sistema

nervoso simpático (FRIEDMAN e HALAAS, 1998). Como resultado, a leptina leva à diminuição da ingestão de energia e a um aumento do gasto energético, reduzindo seu estímulo secretor original, a adiposidade. Esse mecanismo de *feedback* negativo é interrompido em camundongos sem o gene da leptina (camundongos *ob/ob*), que apresentam resposta deficiente da leptina a níveis crescentes de adiposidade e, portanto, persistem em comer demais apesar de se tornarem obesos (FRIEDMAN e HALAAS, 1998).

Crianças que sofreram maus tratos ao longo da infância apresentam atenuação dos níveis de leptina em comparação com um grupo de crianças não maltratadas (DANESE *et al.*, 2014). Em roedores, menores níveis de leptina plasmática e também de corticosterona são encontrados em animais submetidos ao protocolo de estresse por separação neonatal (PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que tanto as situações de estresse como o estado de ansiedade levam ao consumo de alimentos palatáveis para alívio dessas situações desconfortantes, logo se torna interessante avaliar se o uso crônico de “*comfort-food*” é capaz de reverter os sintomas de ansiedade e reduzir os níveis de corticosterona em roedores submetidos ao trauma precoce. Além disso, é importante entender as consequências metabólicas da exposição a esse tipo de alimento em animais expostos ou não ao trauma a fim de identificar vulnerabilidades e potenciais fatores de risco. O trabalho experimental se justifica como gerador de hipóteses para estudos clínicos/translacionais.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito comportamental, neuroendócrino e metabólico do uso crônico de alimento palatável em animais submetidos a um protocolo de trauma precoce.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do comportamento maternal de LG entre as genitoras dos grupos neonatal controle e intervenção.
- Avaliação do consumo alimentar ao longo da vida nos animais controle e intervenção que receberam duas opções de dieta: “*comfort-food*” e dieta regular Prag Soluções®.
- Avaliar os níveis periféricos de leptina, HDL, colesterol total (CT), triglicerídeos, T3, T4 e glicose no plasma na vida adulta dos animais controle e intervenção que receberam as duas opções de dieta acima, bem como mensurar o acúmulo de gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) nesses animais.
- Avaliar fosforilação de proteínas da cascata de sinalização da leptina (SOCS-3 e pSTAT3) no hipotálamo desses animais.
- Avaliar o comportamento do tipo ansioso após a exposição crônica a dieta palatável por 7 semanas, através do teste labirinto em cruz elevada entre quatro grupos: controle e intervenção neonatal recebendo dieta padrão do ratário (Nuvilab®) e outros grupos neonatais similares recebendo a opção de dieta: “*comfort-food*” + dieta regular Prag Soluções® (similar à dieta padrão do ratário Nuvilab®).

- Avaliar a liberação de corticosterona em resposta ao estresse agudo por contenção de movimentos nos quatro grupos expostos acima e mensurar a expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo desses animais.

5. HIPÓTESE

Animais que sofreram trauma precoce quando submetidos ao uso crônico de alimento palatável na vida adulta reduzirão suas medidas comportamentais de ansiedade e a resposta neuroendócrina ao estresse em comparação aos animais expostos ao trauma que permanecerão recebendo dieta regular.

6. METODOLOGIA

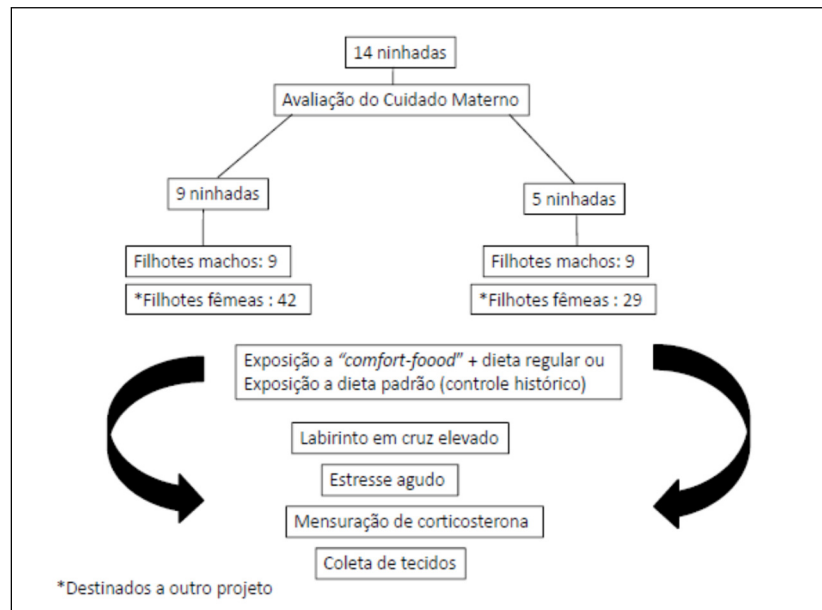
6.1 ANIMAIS

Ratas Wistar nulíparas, provenientes da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA) foram acasaladas nesse local e permaneceram em caixas-moradia padrão da UEA. A partir do sétimo dia gestacional as ratas foram alocadas em caixas-moradia individuais, especialmente desenvolvidas para este modelo animal, medindo 40cm x 40cm x 30cm, com assoalho de malha metálica (1cm x 1cm) que permitisse apenas a passagem das fezes e urina para um coletor localizado na parte inferior da caixa. As fêmeas foram mantidas nessas caixas-moradias com o assoalho recoberto com maravalha e em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 10/14horas (luzes acendiam às 9h e apagavam às 19h), temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, água e comida *ad libitum*. A limpeza das caixas-moradia foi realizada uma vez por semana. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o Dia 0. No dia 2, as fêmeas e suas ninhadas foram randomizadas para dois grupos, controle e intervenção. No dia 10, as fêmeas e seus filhotes foram removidos para uma caixa-moradia padrão, medindo 46 cm x 31 cm x 16 cm, com o assoalho recoberto com maravalha, e mantidos no mesmo ambiente controlado conforme citado acima. No dia 21 de vida, os filhotes foram desmamados e separados por sexo, em três por caixa-moradia, e mantidos em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acendiam às 7h e apagavam às 19h), temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, água e comida *ad libitum*. As fêmeas foram destinadas a outro projeto (número 130424) e neste trabalho foram utilizados somente os machos.

Foram utilizadas no total 14 ninhadas, sendo os filhotes distribuídos para diferentes experimentos, conforme a figura 1abaixo. O tamanho da ninhada variou de 4 a 13, mas a média do número de filhotes não foi diferente entre os grupos (controle: $9,14 \pm 2,60$ e intervenção: $9,85 \pm 2,19$ $p=0,589$), sendo esta variável utilizada como co-variável em várias análises do

presente estudo. As 14 ninhadas utilizadas para a observação do cuidado materno foram divididas em duas coortes e, ao comparar os componentes do cuidado materno entre as duas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

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



Ao completar 60 dias de vida, uma parte dos roedores machos (controle e intervenção) passaram a receber a opção de novas dietas: “*comfort-food*” + dieta regular Prag Soluções® durante todo o experimento. Isso foi feito para que todos os animais enfrentassem os efeitos da neofobia alimentar e, portanto, esse viés pudesse ser diluído entre os diferentes grupos experimentais. Em outras palavras, a ração regular era similar à dieta padrão do ratário Nuvilab® consumida pelos animais até então. O restante dos machos (controle e intervenção) permaneceram recebendo dieta do ratário Nuvilab® (ver figura 3). A água era ofertada *ad libitum* para todos os grupos. Após sete semanas de acesso as dietas, expostas acima, cada animal foi submetido ao teste de comportamento labirinto em cruz elevado e o estresse por contenção de movimentos para coleta de amostras de sangue. Os testes foram realizados em salas comportamentais aclimatadas na UEA.

Figura 2 - Esquema mostrando a distribuição entre os grupos.

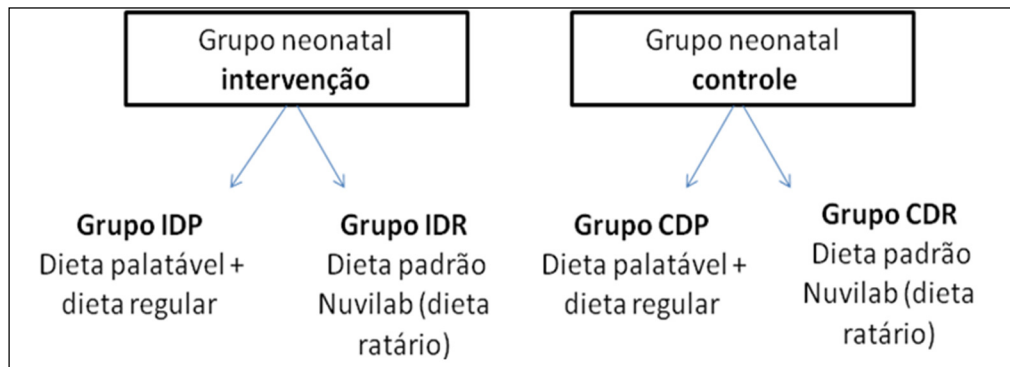
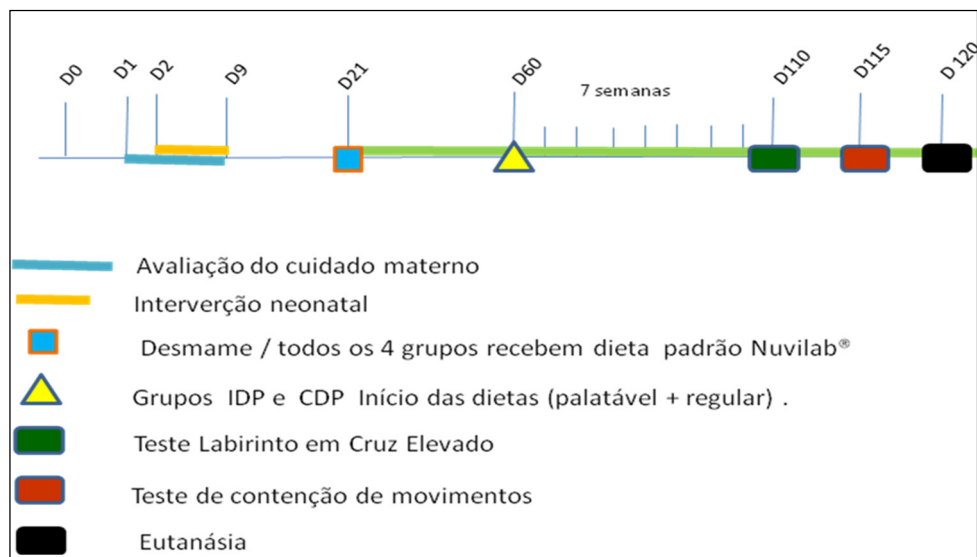


Figura 3 - Desenho experimental.



6.1.1 Grupos Neonatais

Grupo intervenção (ambiente neonatal hostil): seguindo os procedimentos descritos por Ivy et al. (2008), o grupo intervenção teve restrição do material para a confecção do ninho a partir da terceira semana de gestação, quando inicia o comportamento de construção do ninho, até o dia 9 pós-natal. A restrição consistiu em remover a maravalha da caixa-moradia, no dia 2, sem tocar nos animais, e oferecer um total de apenas 2000 cm³ de papel toalha para a confecção de um ninho rudimentar neste período. A urina e as fezes dos animais se depositavam no coletor

localizado na parte inferior da caixa, e o assoalho de malha metálica era, geralmente, conservado limpo pela genitora. Todas as ninhadas foram mantidas sem troca do papel toalha do dia 2 ao dia 9.

Grupo controle: no grupo controle as genitoras tiveram a sua disposição quantidade suficiente de maravalha para a construção do ninho (aproximadamente 7200 cm³). Todas as ninhadas foram mantidas com este volume de maravalha, sem troca de caixa-moradia do dia 2 ao dia 9.

Figura 4 - Grupo controle neonatal. Fonte: Machado 2012.



Figura 5 - Grupo intervenção neonatal. Fonte: Machado 2012



6.1.2 Observações do cuidado materno

Os procedimentos de avaliação do cuidado materno ocorreram na unidade de experimentação animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por integrantes do Grupo DOHaD (Origens Desevolvementistas da Saúde e da doença no adulto).

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

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

- e) Genitora lambendo (*licking and grooming* ou LG) qualquer filhote.

A variável de cuidado materno utilizada neste trabalho foi a frequência de lambidas (LG). Os outros dados de comportamentos podem ser encontrados em (CUNHA, 2015). A frequência de lambidas é avaliada por anotar o número de vezes que a genitora encontra-se lambendo um ou mais filhotes durante a observação do cuidado materno. As lambidas podem acontecer de forma concomitante a outros comportamentos, como a amamentação.

6.1.3 Avaliação do ganho de peso corporal

O peso corporal foi avaliado semanalmente, no dia dos testes e no dia da eutanásia utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g.

6.1.4 Subdivisão dos grupos neonatais em diferentes dietas

Após completar 60 dias de vida, os grupos neonatais (controle e intervenção) foram subdivididos em:

- a) CDP - Controle com dieta regular + “*comfort food*”
- b) IDP - Intervenção com dieta regular + “*comfort food*”
- c) CDR- Controle recebendo dieta padrão do ratário (Nuvilab®)
- d) IDR- Intervenção recebendo dieta padrão do ratário (Nuvilab®)

Os grupos receberam rações durante todo o experimento, portanto mesmo a ração regular era diferente da ração padrão consumida pelos animais até então. A composição da marca NUVILAB® era de 22% de proteína, lipídeos 4,5%, carboidratos 54%, 2,95Kcal/g. A composição da ração regular era: 22% proteína, 4% de gordura, 60% carboidrato, 3,64Kcal/g;

a dieta palatável “*comfort food*” consistia em 14% de proteína, 34% de gordura, 30,2% de carboidrato (sendo 20% em sacarose); 4,82Kcal/g. Ambas as dietas foram produzidas pelo laboratório Prag Soluções Biociências® (São Paulo, Brasil), visando minimizar possíveis vieses. O consumo foi avaliado semanalmente.

Os dados dos grupos que receberam dietas padrão Nuvilab® são controles históricos (CUNHA *et al.* 2017, em preparação) e foram utilizados como controles totais, visto que estes animais não receberam dieta do tipo “*comfort-food*” ao longo da vida, mas seguiram o mesmo protocolo experimental neonatal e também de testes comportamentais. Foi calculada a preferência alimentar por dieta “*comfort-food*” ou percentagem de consumo de alimento “*comfort-food*” em relação ao total consumido através do seguinte cálculo: [consumo de ração “*comfort-food*” / (consumo de ração “*comfort-food*” + consumo de ração regular)]*100.

6.1.5 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é específico para avaliar comportamento do tipo ansioso. No dia do teste os animais foram transferidos para a sala observacional, iluminada com luz vermelha, 30 min antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Os testes ocorreram entre 14 e 16h. O labirinto em cruz elevado consiste em um aparato de madeira elevado do solo a 50cm, formado por dois braços opostos abertos (50x10cm) e dois braços opostos fechados sem cobertura (50x10x40cm) e um quadrado central aberto (10x10cm). Antes de cada animal ser colocado no aparato o local foi higienizado com álcool 70%. No momento do teste o animal foi colocado no quadrado central do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços abertos, e deixado no aparato por 5 minutos, sendo filmado ininterruptamente durante este período. Um observador analisou as filmagens utilizando o programa *Plus MZ*. A frequência de entrada e o tempo de permanência do roedor em cada tipo de braço foram analisados, assim como o número de mergulhos com a cabeça. É tendência natural do animal

explorar o ambiente, ação que denota estado de tranquilidade. Quanto maiores os níveis de ansiedade, maior o percentual de entrada e tempo gasto nos braços fechados. Além disso, menos frequentes são comportamentos de mobilidade como mergulhos com a cabeça (MORATO e PAULO, 2006; PIRES *et al.*, 2012).

6.1.6 Estresse por contenção de movimento

O estresse por contenção de movimento foi realizado por colocação do animal em um tubo plástico incapacitando-o de se mover por 20 min. Um orifício frontal foi deixado permitindo a respiração do animal. Amostras de sangue foram extraídas da ponta da cauda dos animais por meio de um corte de 3 mm com bisturi. O sangue foi coletado nos tempos: T0', anterior a imobilização do animal, T20', 40', 60' e 90'. Ao final do teste o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 5.000 RPM a 4°C. O sobrenadante correspondente ao soro foi distribuído em microtubos e levado ao freezer -80°C onde permaneceu até o dia das análises de corticosterona (ELY *et al.*, 1997).

6.1.7 Coleta de material biológico

Aos 120 dias de vida os animais foram decapitados após jejum de 4h. O sangue do tronco foi coletado em tubos e as amostras centrifugadas a 4000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C e o plasma separado e armazenado a -80°C. Imediatamente após a decapitação os cérebros foram removidos e congelados, através de imersão no Isopentano, e armazenados a -80°C. Posteriormente os cérebros foram descongelados até -20°C e foram realizados *punches* das áreas de interesse (hipocampo, hipotálamo). Os cortes e os *punches* foram realizados manualmente por pesquisadores treinados e com auxílio de um atlas da estrutura cerebral do rato (PAXINOS e WATSON, 2007). A gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foi

dissecada por 2 pesquisadores treinados e pesada, usando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Os resultados da quantidade de gordura abdominal foram calculados como percentual do peso corporal.

6.1.8 **Análise Bioquímicas Periféricas**

As concentrações de corticosterona e leptina foram quantificadas pelo Ensaio Imunoabsorbente por Enzima Ligada (ELISA), utilizando-se reagentes dos respectivos kits comerciais: Corticosterone EIA Kit (Enzo Life Sciences Int'l Inc., USA), e Rat Leptin ELISA Kit (Millipore® USA) seguindo as instruções dos fabricantes. Ambas análises bioquímicas foram realizadas na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os níveis plasmáticos de T3, T4, colesterol total, glicose, triglicerídeos e HDL foram determinados no Laboratório de Análises Clínicas do HCPA.

6.1.9 **Medidas centrais**

SOCS e pSTAT foram analisadas na região do hipotálamo (através da técnica de Western blotting descrita abaixo) nos grupos controle e intervenção que receberam dieta regular + “*comfort food*”.

6.1.10 **Western blotting**

Amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de extração citosol suplementado com protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, P8340) e inibidores de fosfatase (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, 4906845001) e

centrifugados a 6000 RPM durante 2 min a 4 °C. A protea total foi quantificada utilizando um kit de BCA com albumina de soro bovino como um padrão (Proteina Pierce BCA, Thermo Scientific, 23225). Alíquotas do sobrenadante contendo 11µg (hipocampo) ou 70 µg de proteína (hipotálamo) foram incubadas com LDS (Invitrogen, NP0007) e DTT (Sigma-Aldrich, 43815) a 99°C por 3 min. Estas amostras foram submetidas a electroforese utilizando um gel de gradiente de poliacrilamida 4 a 12% (Invitrogen, NP0323BOX) juntamente com um peso molecular convencional (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo scientific, 26634), antes de serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Cuidados de saúde, RPN303C). Os blots foram bloqueados em solução salina tamponada com Tris contendo 5% de concentrado de leite magro e 1% Tween®20 (Sigma, P1379). Nós medimos GR no hipocampo, SOCS3 e pSTAT no hipotálamo. A membrana foi incubada durante a noite a + 4°C com anticorpos primários: GR 1: 1000 (receptor glicocorticoide, peso molecular: 95/90 KDa, Santa Cruz, sc-1004), SOCS3 1: 500 (supressor da sinalização de citocinas, peso molecular: 26 KDa, Cell Signaling, # 2923) e pSTAT3 (1: 1000) (anticorpo fosfo-STAT3, peso molecular: 79/86 KDa, Cell Signalling, # 9145), seguido por anticorpo secundario anti-murganho (1: 2000) (Anti -Mouse IgG, Cell Signaling, # 7076s) ou anti-coelho (1: 2500) (Anti-Rabbit IgG, Cell Signaling, # 7074s) à temperatura ambiente durante 1 h. A membrana foi então exposta em ImageQuant LAS 4000 GE Healthcare Life Sciences usando ECL (ECL sistema de análise western blotting, GE healthcare, RNP2106). Os resultados foram calculados como uma razão de intensidade da proteína de interesse para a da tubulina 1: 2000 (hipocampo) ou 1: 2000-4000 (hipotálamo) (α -tubulina, peso molecular: 50 KDa, Sigma, T6074) na mesma membrana, seguido por anticorpo secundário anti-camundongo (1: 2500) (Cell Signaling, # 7076s). Os resultados foram expressos como porcentagem dos controles.

7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados coletados foram digitados e analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, EUA). ANOVA de uma via foi utilizada para: o GR, o peso das adrenais (ajustando para o tamanho da ninhada), o cuidado materno e a gordura abdominal (ajustando para o tamanho da ninhada e utilizando como fator o grupo neonatal).

A ANOVA de medidas repetidas foi utilizada para: o peso corporal antes e depois das dietas, o consumo de dieta regular e padrão (utilizando como co-variável o tamanho da ninhada usando grupo neonatal como fator. O ajuste pelo tamanho da ninhada quando necessário. Isto é, quando essas co-variáveis afetavam significativamente o desfecho nos resultados de análises preliminares. Foi realizado teste de Teste de Kruskal Wallis para avaliação comportamental no teste de labirinto em cruz elevado. A análise por Equações de Estimção Generalizadas (GEE) foi usada para a resposta hormonal ao estresse agudo (corticosterona). Para as variáveis SOCS-3, pSTAT3 e leptina foi realizado teste de Man-Whitney. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

7.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados em seus aspectos éticos e metodológicos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG/HCPA) (número do protocolo dos projetos 130424 e 140168). Os procedimentos foram realizados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*(Nih) e de acordo com as considerações estabelecidas pela Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pela Lei Arouca (Lei no 11.794 de 8 de outubro de 2008), pelas Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais

para Fins Científicos e Didáticos (DBCA Resolução Normativa no 30, 2016, CONCEA) e pelas Diretrizes para a Prática de Eutanásia do CONCEA (RN 13 de 2013, CONCEA).

8. RESULTADOS

8.1 GRUPO CONTROLE E INTERVENÇÃO

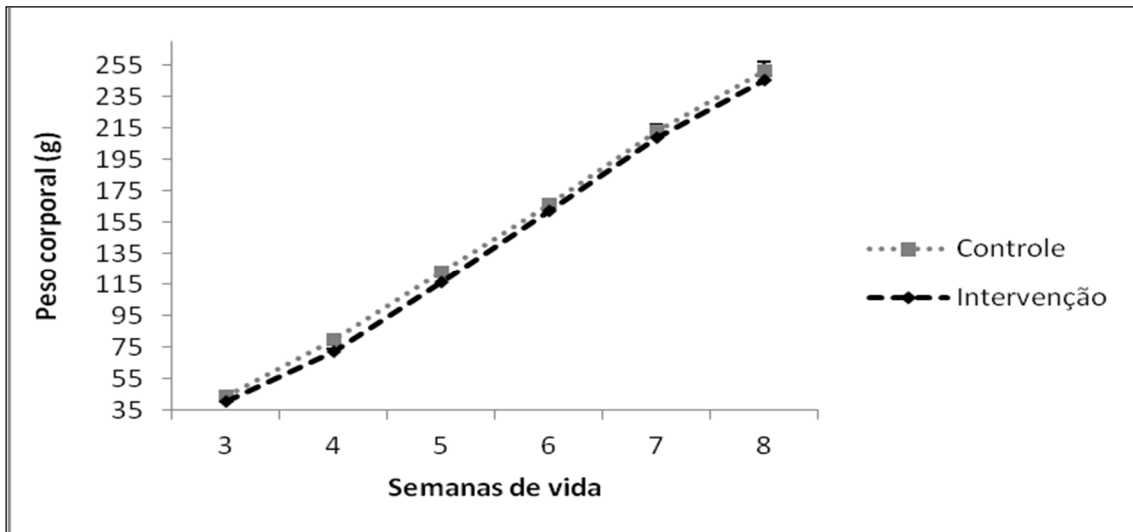
8.1.1 Cuidado materno

As genitoras do grupo intervenção apresentaram uma menor média de LG comparadas as controles [F (1, 11) = 7,421, p = 0,020].

8.1.2 Peso corporal ao longo das primeiras 6 semanas após o desmame

A ANOVA de medidas repetidas, considerando 6 semanas após o desmame (antes do início da dieta), utilizando como co-variável o tamanho da ninhada, demonstrou que houve efeito isolado do tempo [F (5, 75) = 52,137 p<0,0001], onde os animais ganharam peso ao longo das semanas, assim como efeito isolado do tamanho da ninhada [F (1, 15) = 12,573 p=0,003]. Houve interação entre o tempo e o tamanho da ninhada [F (5, 75) = 2,612, p = 0,031], no qual filhotes nascidos de ninhadas maiores ganharam menos peso ao longo do tempo. Não foi encontrada interação entre tempo e grupo neonatal, [F (5, 75) = 0,236, p = 0,945], não existindo diferença significativa no ganho de peso entre os grupos controle e intervenção ao longo do tempo (figura 6).

Figura 6 -Peso corporal, ao longo de 6 semanas, após o desmame nos grupos controle e intervenção

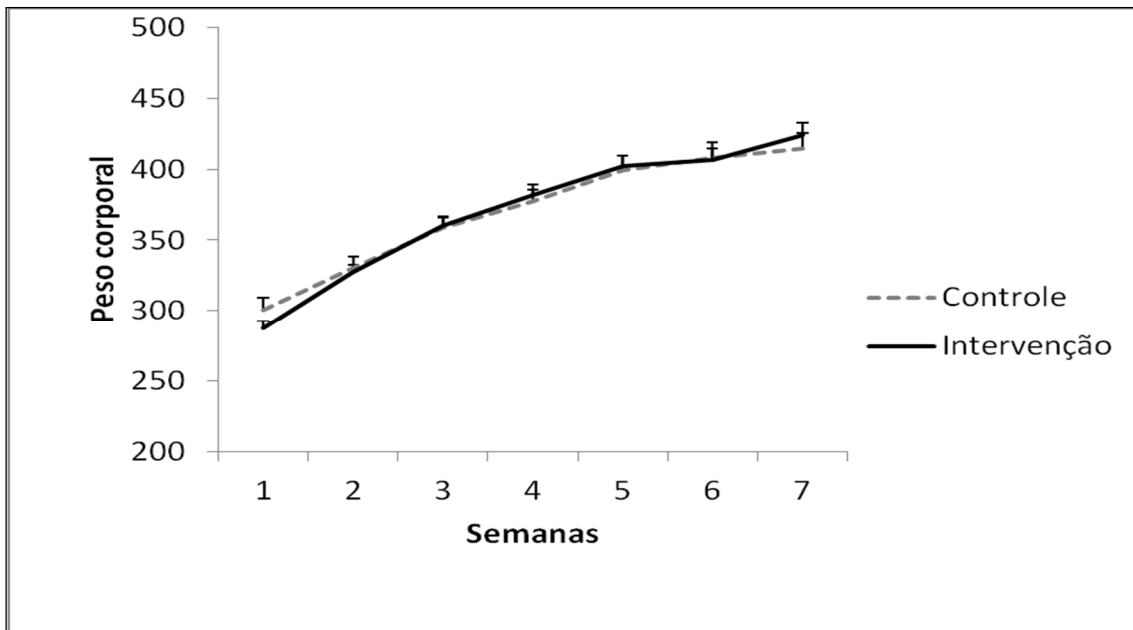


Machos controle (n=8) e intervenção (n=10). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de medidas repetidas não mostrou interação entre tempo e grupo neonatal ($p = 0.945$), somente efeito isolado do tempo.

8.1.3 Peso Corporal ao longo de 7 semanas de dieta

A ANOVA de medidas repetidas, ao longo de sete semanas com as novas dietas, demonstrou que somente houve efeito isolado do tempo [$F(6, 96) = 18,519, p < 0.0001$], mostrando que os animais ganharam peso ao longo das semanas. Não houve interação entre tempo e grupo neonatal [$F(6, 96) = 1,854, p = 0,097$], sem outros efeitos (figura 7).

Figura 7-Peso corporal, ao longo de 7 semanas de dieta nos grupos controle e intervenção

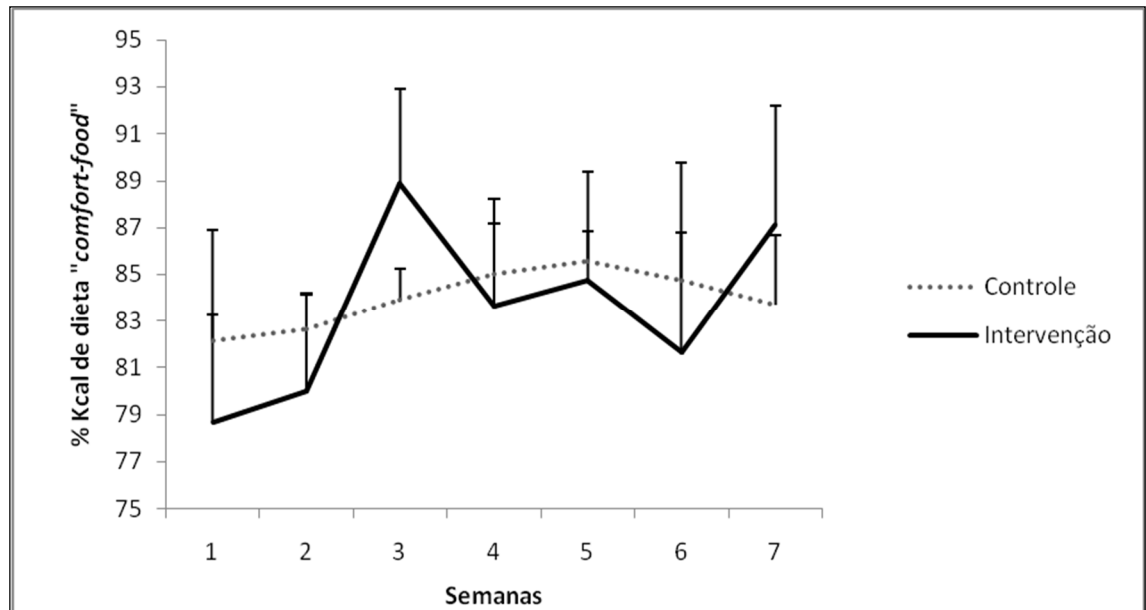


Peso corporal, usando tamanho da ninhada como co-variável, ao longo de 7 semanas de dieta nos machos controle (n=8) e intervenção (n=10). Dados expressos em média \pm EP. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou efeito isolado do tempo ($p < 0.0001$).

8.1.4 Percentual de dieta palatável consumida ao longo de 7 semanas

A ANOVA de medidas repetidas, utilizando como co-variável o tamanho da ninhada, demonstrou que não houve interação entre o consumo de alimento do tipo “*comfort-food*” ao longo do tempo com o grupo neonatal [$F(6, 18) = 0,585, p=0,738$], não havendo outros efeitos (figura 8).

Figura 8- Consumo de ração do tipo “comfort-food” ao longo de 7 semanas pelos grupos controle e intervenção



Consumo de ração do tipo “*comfort-food*” ao longo de 7 semanas pelos grupos nos machos controle (n=8) e intervenção (n=10). ANOVA de medidas repetidas demonstrou que não houve interação entre tempo e grupo neonatal ($p = 0,738$). Valores expressos em média \pm EP.

8.1.5 Gordura abdominal

A análise de gordura abdominal como percentual do peso corporal, através da ANOVA de uma via, utilizando o tamanho da ninhada como co-variável, mostrou diferença estatística entre os grupos. Observou-se o efeito do grupo neonatal, tanto sobre a gordura retroperitoneal [$F(1, 15) = 5,306, p = 0,036$], quanto na gordura gonadal [$F(1, 15) = 7,007, p = 0,018$] e, conseqüentemente no total de gordura abdominal [$F(1, 15) = 7,214, p = 0,017$], sendo maior o percentual de gordura abdominal no grupo intervenção, conforme representado na tabela 1.

Tabela 1 - Percentual de gordura abdominal nos machos, conforme grupo neonatal.

Variável (%)	Controle (n=8)	Intervenção (n=10)	Valor do P
RetroP	1,17±0,13	2,18±0,12	0,036*
Gonadal	1,65±0,11	1,95±0,15	0,018*
Abd. Total	2,82±0,24	4,13±0,27	0,017*

ANOVA de uma via usando como co-variável o tamanho da ninhada, valores expressos em média ± EP, controle (n=8) e intervenção (n=10); * diferenças estatísticas ($p < 0.005$). RetroP: retroperitoneal; Abd. Total: abdominal total.

8.1.6 Análises bioquímicas

Ao analisar os níveis plasmáticos de HDL, colesterol total, triglicerídeos, T4, T3 e glicose através da ANOVA de uma via utilizando o grupo como fator e o peso corporal como co-variável, não se observou efeito do grupo sobre os parâmetros bioquímicos. Os dados completos estão apresentados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2 – Resultados das análises de HDL, colesterol total, glicose, triglicerídeos, glicose, T4 e T3 conforme o grupo neonatal.

Variáveis	Controle (n=8)	Intervenção (n=9)	Valor <i>p</i>
HDL	50.12±4.64	46.44±4.77	0.235
CT	61.00±5.70	60.00±5,59	0.910
TGs	76.50±29.60	82.66±25.64	0.893
Glicose	120.12±16.21	133.55±22.79	0.200
T4	6.09±0.70	5.56±0,39	0.156
T3	120.91±7.90	123.05±7.90	0.355

ANOVA de uma via; usando como co-variável peso corporal; valores expressos em média ± DP; controle (n=8); intervenção (n=9). HDL: lipoproteína de alta densidade CT: colesterol total; TGs: triglicerídeos; T4: tiroxina; T3: triiodotironina

Também observamos que não houveram diferenças estatisticamente significativas nos valores de leptina plasmática e pSTAT, somente a SOCS foi significativa [U=8; p=0,035](tabela 3 abaixo).

Tabela 3 – Análises bioquímicas: medidas centrais no hipotálamo e leptina plasmática.

Variáveis	Controle (n=8)	Intervenção (n=9)	P
	mediana[q1; q3]	mediana[q1; q3]	
SOCS_HT	0.80 [1,02; 2,45]	0.70 [0,80; 0.83]	*0.035
pSTAT_HT	0.89 [1,00; 2,58]	0.79 [0,93; 1.01]	0.142
#Leptina	103.90 [129,83; 199,34]	114.12 [154,71; 237.81]	0.588

Teste de Mann-whitney. Valores expressos em mediana e percentil (q1=25; q3=75). #controle n=6; intervenção n=10.

8.1.7 Teste labirinto em cruz elevado entre os quatro grupos

A análise de tempo/frequência no braço aberto, através do Teste de Kruskal Wallis demonstrou que o grupo controle histórico que recebeu dieta padrão apresenta maior tempo (H=11,073; DF=3; p=0,011)/frequência no braço aberto (H=8,337; DF=3; p=0,040) do que o grupo controle que recebeu “*comfort-food*”. Ou seja, o grupo controle que recebeu “*comfort-food*” apresentou comportamento ansiogênico. Não houveram outros efeitos (tabela 4 abaixo).

Tabela 4 – Variáveis analisadas no labirinto em cruz elevado, conforme a dietas comparando os grupos.

Grupos	tempBA	freqBA
	mediana[q1; q3]	mediana[q1; q3]
Controle “ <i>comfort-food</i> ”	21.86a [9.62; 85.47]	2a [1.00; 4.75]
Controle dieta padrão	104.25b [93.09; 152.01]	5b [4.50; 7.50]
Intervenção “ <i>comfort-food</i> ”	45.49ab [25.30; 123.84]	3ab [2.00; 7.00]
Intervenção padrão	75.03ab [49.77; 90.97]	4ab [3.00; 5.00]
P	0.011	0.040

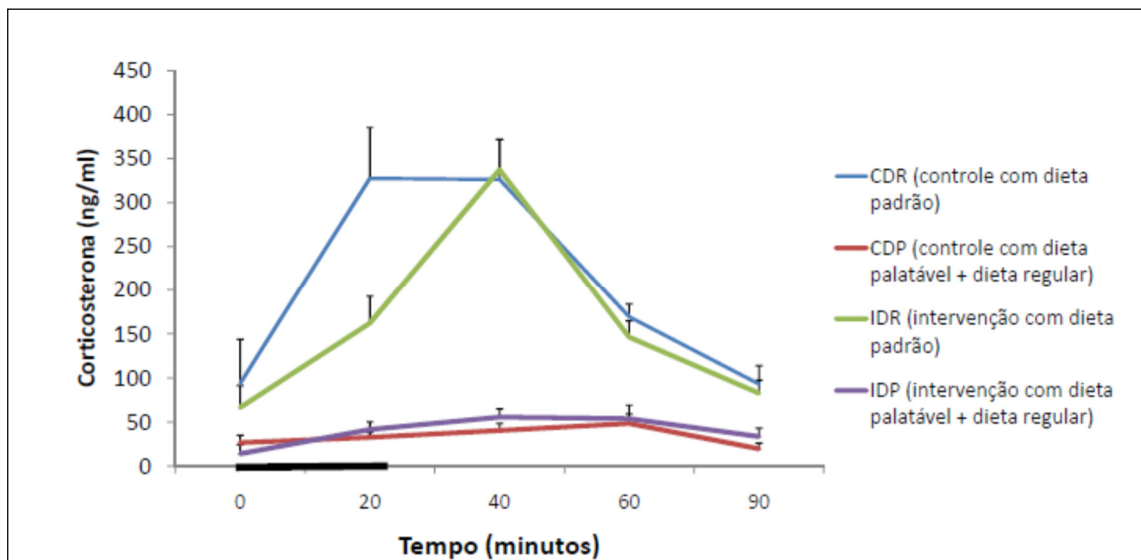
*Letras distintas representam distribuições estatisticamente diferentes

Teste de Kruskal Wallis. tempBA: tempo de permanência no braço aberto (s) freqBA: número de entradas no braço aberto. Valores expressos em mediana e quartil (q1=25; q3=75).

8.1.8 Curva de corticosterona em resposta ao estresse entre os quatros grupos.

Em análise da curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimentos usando Equações de Estimação Generalizadas (GEE), os resultados demonstraram que os grupos que receberam duas dietas apresentaram níveis de corticosterona menores comparados aos que receberam ração padrão (controle histórico), existindo uma interação entre dieta e tempo (GEE, 86, 203: 4, $p < 0.0001$], ou seja, ao longo do tempo os grupos dieta padrão e palatável são diferentes em todos os pontos da curva independente do grupo neonatal. Em outras palavras, vemos que não há efeito do grupo neonatal e sim da dieta. Os roedores (independente do grupo neonatal) que receberam dieta do tipo “*comfort-food*” apresentaram menores níveis de corticosterona ao longo do tempo. Não há interação entre tempo, grupo e dieta (GEE, 5, 430: 4, $p = 0,246$], (figura 9).

Figura 9 - Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimentos nos 4 grupos

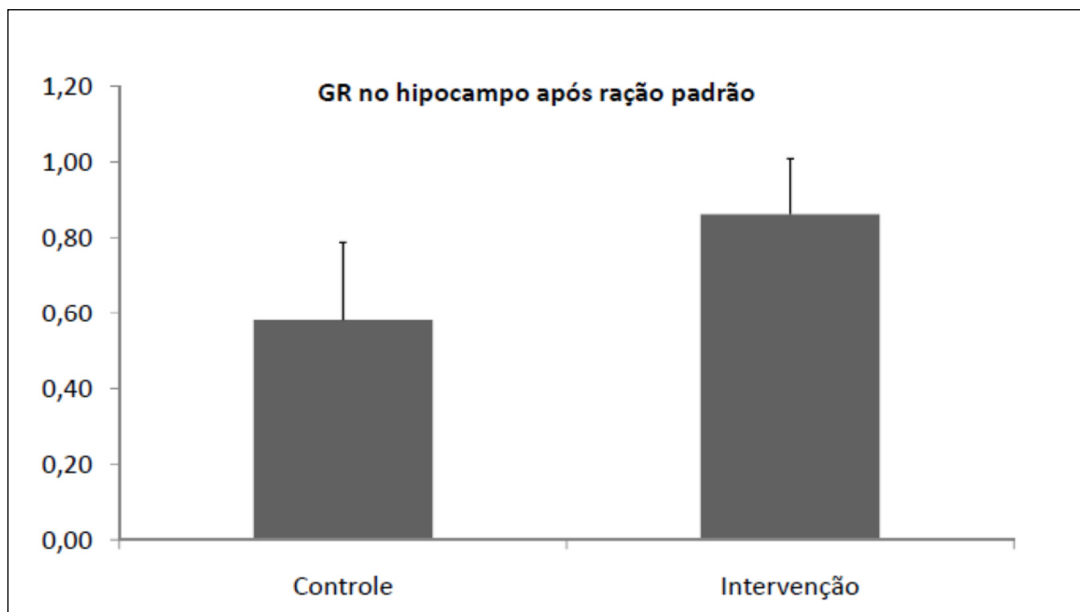


Curva de corticosterona nos machos CDP (n=8), IDP (n=10), CDR (n= 6-7) e IDR (n=9). O período de exposição ao estresse por restrição de movimentos compreende o intervalo de tempo (T0' ao T. 20'). Dados expressos em média \pm EP. A análise por Equações de Estimação Generalizadas demonstrou que os grupos que receberam duas dietas apresentaram níveis de corticosterona menores comparados aos que receberam ração padrão, $p < 0.0001$.

8.1.9 Conteúdo de glicocorticoides no hipocampo

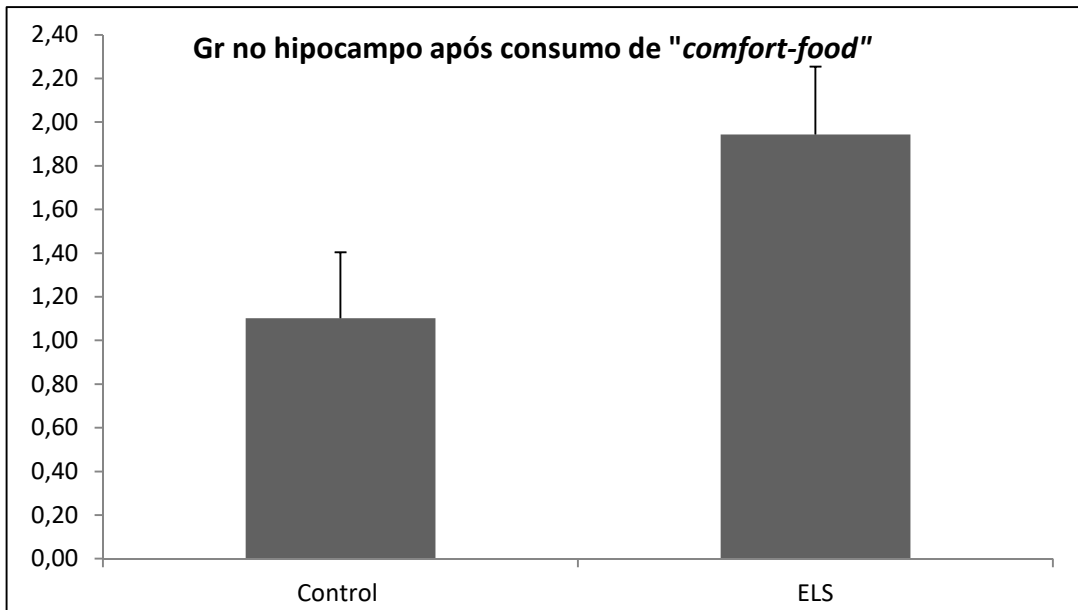
Em relação às medidas bioquímicas centrais, as figuras a seguir demonstram o conteúdo de GR no hipocampo dos animais. ANOVA de uma via não demonstrou diferenças estatísticas no conteúdo de GR no hipocampo entre os grupos intervenção e controle após o consumo de dieta padrão [(F11, 72069,829) = 0,732, p = 0,410] (Figura 10). Por outro lado, após o consumo de dieta “*comfort-food*” o grupo intervenção apresentou um aumento significativo no conteúdo de GR no hipocampo comparado ao grupo controle [(F11, 7930) = 0,5750, p = 0,040] (Figura 11).

Figura 10- Conteúdo de receptores de glicocorticoide no hipocampo dos grupos controle e intervenção com o consumo de dieta padrão



ANOVA de uma via, valores expressos em média \pm EP; controle (n= 7), intervenção (n=7), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, p=0,410.

Figura 11– Conteúdo de receptores de glicocorticóides no hipocampo dos grupos controle e intervenção que receberam a dieta “comfort-food”



ANOVA de uma via, valores expressos em média \pm EP; controle (n= 5), intervenção (n=7) demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, $p=0,040$.

9. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho consistiram em: menor frequência de LG (*licking and grooming*) das genitoras do grupo intervenção; ausência de diferenças em relação aos parâmetros bioquímicos de HDL, colesterol total, triglicerídeos, T4, T3 e glicose entre os grupos controle e intervenção na vida adulta, porém com diferenças nos níveis de SOCS, sem diferença nos níveis de leptina e pSTAT no hipotálamo. Não houveram diferenças no peso corporal antes e após a exposição à dieta palatável, assim como não foram observadas diferenças entre os grupos no consumo de ração padrão e dieta palatável. Todavia, após o uso crônico da dieta palatável (sete semanas) o grupo intervenção apresentou maior acúmulo de gordura abdominal (retroperitoneal e gonadal) e aumento da expressão de GR no hipocampo. Além disso, o consumo crônico de dieta palatável promoveu um comportamento do tipo ansioso no grupo controle neonatal mas sem diferenças entre os grupos intervenção e controle. No teste de estresse agudo por contenção de movimentos os grupos que consumiram dieta do tipo

“*comfort-food*” apresentaram menores níveis de corticosterona ao longo do tempo independente do grupo neonatal.

A estimulação tátil nos roedores, caracterizado pelo ato da genitora lambe os filhotes no período pós natal, especialmente nos primeiros 10 dias de vida, modifica as respostas ao estresse. A prole de mãe com alto padrão LG, realizam lambidas com maior frequência e isso leva a alterações epigenéticas que culminam com maior expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo (LIU *et al.*, 1997; MEANEY *et al.*, 2000; WEAVER *et al.*, 2004) e redução plasmática de corticosterona em situações de estresse, e por conseguinte maior sensibilidade aos glicocorticóides quando comparada a mães de baixo padrão LG (LIU *et al.*, 1997). Desse modo variações no comportamento materno podem programar as respostas do eixo HPA na prole (MEANEY *et al.*, 2000; WEAVER *et al.*, 2004) promovendo uma hipercapacidade de estresse mais tarde na vida adulta (DALLE MOLLE *et al.*, 2012). Portanto, o ato da genitora lambe os filhotes tem sido implicado na redução de respostas ao estresse nos filhotes (PARFITT *et al.*, 2004; IVY *et al.*, 2008; BARAM *et al.*, 2012).

Nesse estudo adotamos um modelo de estresse neonatal que propicia uma situação de estresse crônico ao invés de intermitente e tem se mostrado eficaz em produzir um ambiente estressor (IVY *et al.*, 2008; MOLET *et al.*, 2014). No modelo de restrição do material para confecção do ninho a genitora está presente, no entanto, diante dessa situação adversa ela apresenta um comportamento materno fragmentado e disfuncional, manipulando grosseiramente os filhotes (IVY *et al.*, 2008; RICE *et al.*, 2008; BARAM *et al.*, 2012). Ivy observou que as genitoras do grupo intervenção apresentam comportamento do tipo ansioso, níveis elevados de corticosterona e maior tamanho das adrenais, sugerindo que a alteração do material para construir o ninho (situação adversa) leva ao estresse materno e diminuição da habilidade de exercer um comportamento materno padrão (IVY *et al.*, 2008). Seguindo esse mesmo protocolo foi observado que quanto maior a restrição do material para confeccionar o

ninho, maior a fragmentação da interação materna e maiores níveis de corticosterona no plasma dos filhotes aos 9 dias pós natal. Além disso, foi encontrada uma redução de 75% na expressão de CRH no hipotálamo da prole do grupo intervenção comparado ao controle. Esses resultados também foram encontrados em animais na vida adulta (AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001; RICE *et al.*, 2008).

No presente estudo não houveram diferenças em relação aos parâmetros bioquímicos de HDL, colesterol total, triglicerídeos, T4 e T3 entre os grupos controle e intervenção na vida adulta após a exposição à dieta “*comfort-food*”. Roedores machos que passaram por protocolo similar de trauma neonatal, consumindo somente ração padrão ao longo da vida, também não apresentam diferenças nas medidas bioquímicas analisadas de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicose (DALLE MOLLE, 2011). Uma dieta “*comfort-food*” pode afetar os níveis do hormônio T3 em roedores que passaram por trauma neonatal (MACHADO *et al.*, 2017). Curiosamente existe uma correlação negativa entre o LG (medida de cuidado materno) e T3, ou seja, quanto menores os níveis de LG maiores os níveis de T3 em roedores fêmeas. Após a exposição crônica a uma dieta “*comfort-food*” essa correlação desaparece (MACHADO *et al.*, 2017). Talvez esses efeitos bioquímicos sejam sexo-específicos. Infelizmente não tivemos um grupo que recebeu somente ração padrão do ratário para realizar a comparação antes e após exposição à dieta “*comfort-food*” em relação as variáveis bioquímicas analisadas. No presente estudo os roedores do grupo intervenção e controle não demonstraram diferenças significativas no ganho de peso após o desmame por seis semanas antes do início das dietas. Este achado está em conformidade com outro estudo que, ao utilizar esse modelo de estresse neonatal, não encontrou diferença no peso corporal dos animais de ambos sexos que consumiram ração padrão ao longo de 8 semanas de acompanhamento (DALLE MOLLE *et al.*, 2012). Interessantemente a diferença de peso corporal nesse modelo parece apresentar resultados distintos de acordo com o sexo. Ao replicar esse protocolo

utilizando somente fêmeas é visto que as mesmas do grupo intervenção apresentam menor peso corporal comparada aos controles neonatais quando alimentadas com ração padrão (MACHADO *et al.*, 2013). Na manipulação neonatal (outro modelo de estresse no início da vida) não é observada diferença de peso corporal ao longo do desenvolvimento de machos e fêmeas recebendo dieta padrão (SILVEIRA *et al.*, 2004).

Outro resultado curioso demonstrado no presente estudo foi que após a exposição por sete semanas a dieta regular e palatável não houve diferença no ganho de peso corporal entre os grupos neonatais (controle e intervenção). Seguindo o mesmo protocolo de estresse neonatal, utilizado no presente estudo, não foram vistas diferenças no peso corporal de machos que receberam dieta palatável por sete semanas (MANIAM *et al.*, 2016). No entanto, quando observado somente o efeito da dieta, outro estudo demonstrou diferenças no ganho de peso corporal das fêmeas após seis semanas de alimentação com dieta hiperlipídica (SIVANATHAN *et al.*, 2015). E, em machos, diferenças significativas de peso só foram achadas após 7 semanas de dieta com alto teor de gordura (SHARMA *et al.*, 2013). Devemos considerar que nenhum dos últimos dois estudos utilizou modelo de estresse crônico, contrastando com observações feitas em ratos submetidos a estresse crônico na vida adulta, que não apresentam diferenças no ganho de peso com acesso a dieta rica em gordura por 10 semanas (KAMARA *et al.*, 1998). Dessa forma, o estresse no início da vida e na idade adulta parece ter efeito sobre o ganho de peso, não alterando o peso desses animais mesmo na presença de alimentos do tipo “*comfort-food*”. Variações do tipo de estresse promovem diferentes efeitos sobre a ingestão de alimentos (MARTI *et al.*, 1994) com impacto direto sobre o peso corporal. Por exemplo, enquanto a manipulação neonatal leva ao aumento na ingestão de alimentos palatáveis sem diferenças no peso corporal (SILVEIRA *et al.*, 2004), o estresse por derrota social leva à hipofagia em animais, mesmo na presença de alimento hiperlipídico, com consequente perda de peso (FINGER *et al.*, 2011). Além disso, hiperfagia transitória pode ser observada em

períodos em que ocorrem troca de dietas com posterior ajuste na ingestão de calorias (KAMARA *et al.*, 1998). Dessa forma, nossas observações quanto a ausência de diferenças no ganho de peso entre os grupos controle e intervenção pode estar relacionada ao ajuste no consumo alimentar e ao tipo de estresse empregado.

A quantidade de calorias consumidas pode ser alterada pela exposição aguda ou crônica ao estresse. Embora existam associações entre estresse e ingestão de alimentos (MANIAM e MORRIS, 2010; MANIAM *et al.*, 2016), essa relação não é observada em todos os estudos (ULRICH-LAI *et al.*, 2015). No presente trabalho não foram observadas diferenças no consumo de dieta palatável e ração regular entre os grupos controle e intervenção. É conhecido que as fêmeas neste modelo de trauma preferem consumir alimentos ricos em gordura e açúcar quando comparados aos controles neonatais (MACHADO *et al.*, 2013). O aumento da ingestão de alimentos contendo açúcar e ingredientes gordurosos como um alimento de conforto é proposto para "compensar" os efeitos do estresse, tanto em humanos (EPEL *et al.*, 2001) quanto em roedores (PECORARO *et al.*, 2004). Animais submetidos ao estresse crônico por choque preferem alimentos palatáveis quando há a opção de escolha entre duas dietas (ORTOLANI *et al.*, 2011). Maniam e Morris também observaram que animais que passam por separação materna ingerem quantidades superiores de ração padrão comparados ao grupo controle. E quando tinham acesso a dieta palatável, o consumo de calorias continuava superior ao do grupo controle (MANIAM e MORRIS, 2010). Nesse último estudo sugere-se que existe um aumento na ingestão calórica em resposta ao estresse neonatal, tanto na presença quanto ausência de dieta palatável. O aumento na preferência por alimentos palatáveis, independente da saciedade, também foi observado em resposta ao estresse moderado (ELY *et al.*, 1997). Porém, no presente trabalho não encontramos maior consumo de ração palatável nos machos do grupo intervenção neonatal. Podemos inferir que esse resultado pode ser sexo-específico ou que talvez o tempo de exposição foi pouco para captar a diferença no consumo alimentar desses animais. Nossos

resultados estão em concordância com outro estudo que utiliza o mesmo modelo de estresse neonatal, onde uma dieta rica em gordura e açúcar é capaz de diminuir marcadores de ansiedade (MANIAM *et al.*, 2016). Ainda assim, estudos com animais e humanos (ELY *et al.*, 1997; TOMIYAMA *et al.*, 2011; ARCE *et al.*, 2010)) propõem que os alimentos palatáveis tendem a ser escolhidos em períodos de estresse, podendo ou não ocorrer o aumento da ingestão calórica (DALMAN, 2010). Vários fatores podem estar envolvidos como glicocorticóides e liberação de leptina e insulina (ADAM e EPEL, 2007; DALLMAN, 2010). No entanto, no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas na glicemia entre os grupos controle e intervenção que recebem dieta palatável (IDP e CDP).

De forma interessante observamos que o grupo intervenção apresentou maior acúmulo de tecido adiposo visceral. Anteriormente, seguindo o mesmo protocolo de estresse neonatal ao utilizar fêmeas, Machado e colaboradores não observaram diferenças na quantidade de gordura abdominal após o consumo de dieta palatável (MACHADO *et al.*, 2013). Porém, no presente estudo, que utilizou somente machos, houve acúmulo de gordura abdominal (retroperitoneal e gonadal) embora não tenhamos encontrado diferenças no peso corporal após a exposição crônica as dietas palatável e regular. Esses resultados demonstram que possivelmente possa existir uma diferença na composição corporal no grupo intervenção, quando comparado ao grupo controle que não pode ser evidenciada nem pelo aumento no consumo de energia quanto pelo ganho de peso entre os grupos. O estresse no início da vida leva à hiperatividade crônica do eixo HPA, que por sua vez pode causar acúmulo de tecido adiposo visceral (BJORNTORP, 2001) promovendo mudanças metabólicas e mobilização de aminoácidos e ácidos graxos periféricos para serem usados na síntese de glicose pelo fígado (DALLMAN *et al.*, 2003). Isso sugere que os efeitos dos glicocorticóides promovem uma redistribuição da energia armazenada, aumentando a adiposidade abdominal e diminuindo a massa magra. Ou seja, no estresse crônico e com a presença elevada de glicocorticóides a redistribuição de energia ocorre

para favorecer a adiposidade visceral podendo ou não estar acompanhada do aumento na ingestão e peso corporal (DALLMAN *et al.*, 2003).

Animais submetidos a uma dieta palatável enriquecida com sacarose, porém sem o protocolo de estresse associado, apresentam intolerância a glicose, resistência a insulina e aumento do tecido adiposo sem diferenças no peso corporal (SOUZA *et al.*, 2007). Contudo, animais submetidos a um protocolo de estresse por separação materna e alimentados cronicamente com dieta palatável apresentam aumento no tecido adiposo visceral porém acompanhado por maior peso corporal (BUWALDA *et al.*, 2001; MANIAM e MORRIS, 2010). É proposto que os glicocorticóides atuam favorecendo o consumo de alimentos palatáveis, promovendo o aumento da adiposidade visceral que serviria como um sinal secundário ao *feedback* negativo do eixo HPA, ou seja um *feedback* metabólico, diminuindo o estresse percebido pelo organismo (DALLMAN *et al.*, 2003, ADAM; EPEL, 2007). No presente estudo, o grupo intervenção apresentou maior acúmulo de gordura visceral e ganho de peso semelhante ao controle, mas não foram encontradas diferenças quanto a glicemia nem atividade tireoidiana, embora a resistência a insulina não tenha sido verificada. Lembramos que em nosso grupo de pesquisa usando o mesmo protocolo neonatal porém sem a exposição a dieta do tipo “*comfort-food*”, os roedores machos não apresentam diferenças no acúmulo de gordura abdominal (DALLE MOLLE, 2011). Destacamos que o grupo intervenção apresentou menores níveis de SOCS no hipotálamo comparados com o grupo controle, apesar de não haver diferença nos níveis de leptina. Existem evidências de que indivíduos obesos teriam elevados níveis sanguíneos de leptina, apesar de isso ainda de não ser consenso (LUBIS *et al.*, 2008). Na obesidade ocorre o aumento da concentração plasmática de leptina e ao mesmo tempo o aumento da expressão de (SOCS-3). Um dos mecanismos de resistência à leptina seria a interrupção no processo de transdução através da ativação do ativador de sinal de quinase 2-ativador da transcrição 3 (JAK2-STAT3) nos receptores de leptina pelo supressor da sinalização

de citocinas-3 (SOCS- 3) (LUBIS *et al.*, 2008). A SOCS-3 é uma proteína que inibe o processo de transdução de sinal de várias citocinas no organismo, incluindo a leptina (LUBIS *et al.*, 2008). É possível inferir que o grupo intervenção tenha menor expressão de leptina pelo tecido adiposo. Esse entendimento é consistente com os achados de resposta a leptina, em que crianças expostas a maus tratos apresentaram menores níveis de leptina em relação ao tecido adiposo corporal, indicando uma deficiência deste hormônio (DANESE *et al.*, 2014). Os roedores em nosso estudo não são obesos, mas apresentaram maior de acúmulo de gordura abdominal comparado ao controle, assim como níveis menores de SOCS-3. Os resultados sugerem que os animais que passaram pelo estresse no início da vida têm baixos níveis de leptina, o que a longo prazo pode ser prejudicial levando a hiperfagia e consequente ganho de peso.

É importante compreendermos que a ingestão de alimentos no grupo intervenção foge ao padrão encontrado no grupo controle, mesmo que não tenhamos encontrado, entre os grupos, diferenças na preferência por alimento palatável, o grupo intervenção tem maior variação no consumo alimentar, alternando entre redução e aumento no consumo o que poderia estar relacionado a alterações na secreção de leptina.

Infelizmente no presente estudo não foi possível fazer análise dos controles históricos por falta de material biológico. Seria interessante realizar a análise comparando os grupos não expostos à dieta do tipo “*comfort-food*” visando entender melhor o resultado encontrado. De qualquer forma demonstramos que o sinal de inibição do processo da leptina, via SOCS-3, é menor no grupo exposto ao trauma que consumiu dieta do tipo “*comfort-food*”.

Nesta pesquisa surpreendentemente observamos que grupo controle histórico neonatal ao receber dieta palatável cronicamente apresenta menor tempo de permanência/ frequência entrada no braço aberto do labirinto em cruz elevado, ou seja, parece apresentar um comportamento do tipo ansioso induzido pela dieta. Os nossos achados são apoiados por outros estudos que demonstram que uma dieta do tipo palatável (rica em açúcar e gordura) pode ser

ansio gênica, como observado em roedores machos adultos expostos a dieta palatável que apresentam maior ansiedade em tarefa exploratória no campo aberto (SOUZA *et al.*, 2007). Outro estudo também encontrou comportamento relacionado a ansiedade, quando investigado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado (SHARMA e FULTON, 2013). Por outro lado, outras descobertas sugerem que o consumo de dieta palatável reduz comportamento semelhante a ansiedade em roedores independente do grupo neonatal (BUWALDA *et al.*, 2001; MANIAM e MORRIS, 2010; AUVINEN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2015; MCNEILLY *et al.*, 2015; MANIAM *et al.*, 2016). Um estudo clássico demonstra que mesmo a exposição em curto prazo (7 dias) a uma dieta rica em gordura diminuiu parâmetros de ansiedade em ratos adultos machos avaliados no teste de labirinto em cruz elevado (PRASAD e PRASAD, 1996). O tempo de exposição à dieta pode estar relacionado com os efeitos antagonicos sobre a ansiedade. Por exemplo, na ausência de estresse, o consumo crônico de dieta palatável por 10 (SIVANATHAN *et al.*, 2015), 12 (SHARMA e FULTON, 2013) ou 16 semanas (SOUZA *et al.*, 2007) aumenta o comportamento do tipo ansioso. Um ponto a ser considerado é a questão da idade dos animais. É visto que os roedores alimentados com dieta palatável em estágios iniciais do desenvolvimento, logo após o desmame, demonstram um perfil menos ansio gênico quando comparado aos ratos adultos (WARNEKE *et al.*, 2014). Em nosso estudo essa hipótese não se sustenta visto que a ansiedade aumentou somente nos controles que receberam “*comfort-food*”. Outra hipótese é que os efeitos ansiolíticos estejam envolvidos quando a ingestão da dieta palatável é precedida por eventos estressantes (MORRIS *et al.*, 2014).

Em relação aos níveis de corticosterona em resposta ao estresse agudo também observamos que os grupos que receberam dieta palatável (IDP e CDP) apresentaram menores níveis de corticosterona comparado aos grupos que receberam dieta padrão (IDR e CDR). Esse resultado foi independente do grupo neonatal havendo somente o efeito da dieta. Roedores alimentados com dieta rica em gordura apresentam aumento na expressão de CRH no

hipotálamo e diminuição nos níveis de corticosterona circulante (AUVINEN *et al.*, 2012). O aumento da expressão de CRH no hipotálamo leva a inibição central e portanto um amortecimento do eixo HPA. Ainda assim, nossos resultados não podem ser facilmente justificados visto que os estudos demonstram redução nos níveis de corticosterona na presença de acúmulo do tecido adiposo visceral (BUWALDA *et al.*, 2001, AUVINEN *et al.*, 2012). No nosso estudo, entre os grupos com acesso a dieta palatável, o acúmulo de tecido adiposo foi evidenciado somente no grupo intervenção (IDP). Como já mencionado acima, o tecido adiposo visceral serviria como *feedback* metabólico do eixo HPA reduzindo o estresse percebido pelo organismo. Embora não tenhamos encontrado efeito do estresse neonatal sobre os níveis de corticosterona em resposta ao estresse agudo é estabelecido que o estresse em períodos críticos do desenvolvimento da prole, com a exposição precoce aos glicocorticóides, está associada com o aumento da atividade do eixo HPA em situações basais e de estresse (LIU *et al.*, 1997; WEAVER *et al.*, 2004). Foi constatado em roedores machos níveis aumentados de corticosterona somente 24h após o desafio de estresse agudo em animais que passaram anteriormente pelo estresse crônico independente da dieta (FINGER *et al.*, 2011). Esses resultados podem potencialmente indicar uma desregulação da função do eixo HPA em resposta ao estresse. Contudo, vale ressaltar que ao contrário do presente estudo, Finger utilizou um modelo de estresse crônico na vida adulta (FINGER *et al.*, 2011).

No cérebro adulto a exposição a alterações epigenéticas podem ocorrer de forma transitória. Já em períodos do desenvolvimento alterações epigenéticas podem ser persistentes, no entanto o cérebro se reorganiza em resposta a mudanças no ambiente (PATCHEV *et al.*, 2014). Dessa forma, diferentes tipos de estressores e a fase da vida em que eles ocorrem podem provocar efeitos ainda não bem esclarecidos por promoverem alterações moleculares no sistema nervoso central (AVISHAI-ELINER *et al.*, 2001) e que não puderam ser esclarecidos nesse estudo. Roedores machos alimentados com dieta rica em gordura por 12 semanas apresentam

elevação de corticosterona e ACTH plasmática após estresse agudo por restrição de movimentos (MCNEILLY *et al.*, 2015). De acordo com os nossos achados de corticosterona em resposta ao estresse agudo, é importante notar o papel influente da dieta sobre a resposta ao estresse, visto que os animais que recebem dieta palatável secretam níveis menores de corticosterona comparado aos grupos que recebem dieta padrão.

Como discutido anteriormente, a maioria dos estudos apontam que uma dieta rica em gordura reduz respostas comportamentais e fisiológicas do estresse. Esse dado também foi observado em estudos que utilizam dieta rica em glicose (ULRICH-LAI *et al.*, 2015; REBOLLEDO-SOLLEIRO *et al.*, 2017). Nós observamos que a alimentação crônica com dieta palatável, na vida adulta, leva a comportamentos de ansiedade em roedores machos controles, sem alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona após estresse agudo. Do mesmo modo, o perfil comportamental ansiogênico dos animais controles alimentados com dieta palatável não se correlacionou com o peso corporal, tecido adiposo visceral e as concentrações de glicose no plasma. É importante notar, no entanto, que este estudo propôs a confecção de uma dieta palatável com composição de 14% de proteína, 34% de gordura, 30,2% de carboidrato (sendo 20% em sacarose), com 4,82Kcal/g, similar aos alimentos encontrados diariamente e consumidos pelos seres humanos (INSTITUTE OF MEDICINE., 2005; PADOVANI *et al.*, 2006). Foi relatado que alimentação rica em gordura pode gerar mudanças neurobiológicas e sintomatologia depressiva antes mesmo do desenvolvimento da obesidade (SHARMA *et al.*, 2013). A extensa literatura difere no uso da composição da dieta, tipo e duração do estressor que podem estar ligados aos achados conflitantes.

A exposição ao estresse no início da vida não mostrou efeito sob o conteúdo de GR no hipocampo dos grupos alimentados com dieta padrão (IDR e CDR). Contudo encontramos um aumento significativo da expressão do GR no hipocampo, após o consumo da dieta palatável, pelo grupo intervenção (IDP) quando comparado ao grupo controle que recebeu a mesma dieta

(CDP). Ou seja, a exposição ao estresse no início da vida, quando há presença de dieta palatável, parece ter relação com o aumento da expressão de GR hipocampal.

A literatura parece ser bem conflitante quanto a questão do consumo de dieta palatável e expressão de GR no hipocampo. Nossos resultados corroboram com Morris 2016 que encontrou um aumento de 45% no conteúdo de GR no hipocampo dos roedores expostos a estresse pós natal após o consumo crônico de dieta palatável comparado aos controles (MANIAM *et al.*, 2016). Apesar disso, já foi documentada uma redução da expressão de GR no hipocampo de fêmeas que receberam uma dieta altamente hiperlipídica com 60% de gordura por 12 semanas (SIVANATHAN *et al.*, 2015). Outro estudo demonstra que a expressão de GR no hipocampo é inalterada após a submissão de roedores a diferentes tipos de dietas por 8 semanas (HRYHORCZUK *et al.*, 2017). Uma limitação dos estudos citados é que os mesmos não utilizam protocolos de estresse (SHATHVEEKAN *et al.*, 2015;(HRYHORCZUK *et al.*, 2017).

Coletivamente os nossos achados demonstram que os animais expostos ao estresse neonatal, na presença de dieta palatável, acumulam facilmente gordura abdominal, que pode servir como sinal de *feedback* reduzindo o estresse percebido pelo organismo (DALMAN, 2010). Animais estressados por separação materna apresentam menor expressão de 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase 1 (11 β -HSD1) no tecido adiposo após consumo crônico de dieta palatável (MANIAM e MORRIS, 2010). A enzima 11 β -HSD1 é expressa no tecido adiposo visceral e catalisa a ativação de de 11-desidrocorticosterona inativa para corticosterona ativa. Ou seja, os animais do grupo intervenção após consumo de dieta palatável acumulam facilmente tecido adiposo visceral e possivelmente passariam a ter uma menor expressão da enzima 11 β -HSD1 e, como um mecanismo de *feedback* adicional, reduziriam a conversão e a exposição tecidual a corticosterona ativa. Além disso, esses animais (estresse neonatal + consumo de dieta palatável), apresentam aumento na expressão de GR no hipocampo que

auxiliaria na inibição da resposta ao estresse (LIU et al., 1997, MEANEY et al., 2000; WEAVER et al., 2004). Tendo em vista que a expressão de CRH não é alterada pelo consumo crônico de dieta palatável em animais que passaram por estresse neonatal (MANIAM e MORRIS, 2010) é possível que por esses dois mecanismos (acúmulo de tecido visceral e aumento dos receptores de GR hipocampal) possa ocorrer a atenuação das respostas fisiológicas e comportamentais observadas no nosso estudo nos roedores com estresse neonatal após consumo crônico de dieta palatável.

10. CONCLUSÃO

O trauma neonatal associado a uma dieta do tipo “*comfort-food*” induz ao acúmulo de gordura corporal levando a menores níveis de SOCS no hipotálamo sem diferenças nos níveis de leptina. Provavelmente ocorra uma correlação negativa entre o total de gordura corporal e leptina sérica, indicando uma deficiência desse hormônio no grupo intervenção. A dieta do tipo “*comfort-food*” foi capaz de induzir ao comportamento ansioso no grupo controle. Além disso, a dieta foi capaz de induzir a um aumento de GR no hipocampo no grupo intervenção.

Surpreendentemente, a resposta neuroendócrina ao estresse foi independente do grupo neonatal. A dieta do tipo “*comfort-food*” é capaz de reduzir os níveis hormonais de corticosterona independente da história neonatal de trauma vivenciada.

11. REFERÊNCIAS

- ADAM, T. C.; EPEL, E. S. Stress, eating and the reward system. **Physiol Behav**, United States, v. 91, n. 4, p. 449-58, 2007. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.
- ALVAREZ, J. et al. The relationship between child abuse and adult obesity among california women. **Am J Prev Med**, v. 33, n. 1, p. 28-33, Jul 2007. ISSN 0749-3797 (Print) 0749-3797 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572308>>.
- ARCE, M. et al. Diet choice, cortisol reactivity, and emotional feeding in socially housed rhesus monkeys. **Physiol Behav**, v. 101, n. 4, p. 446-55, Nov 2 2010. ISSN 0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.07.010>>.
- AUVINEN, H. E. et al. The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. **J Endocrinol**, v. 214, n. 2, p. 191-7, Aug 2012. ISSN 0022-0795. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/joe-12-0056>>.
- AVISHAI-ELINER, S. et al. Altered regulation of gene and protein expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis components in an immature rat model of chronic stress. **J Neuroendocrinol**, England, v. 13, n. 9, p. 799-807, 2001. ISSN 0953-8194 (Print)0953-8194 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 327-35, Sep 2015. ISSN 1294-8322. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- BARAM, T. Z. et al. Fragmentation and unpredictability of early-life experience in mental disorders. **Am J Psychiatry**, v. 169, n. 9, p. 907-15, Sep 2012. ISSN 0002-953x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.11091347>>.
- BJORBAEK, C.; KAHN, B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. **Recent Prog Horm Res**, v. 59, p. 305-31, 2004. ISSN 0079-9963 (Print)0079-9963. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- BJORNTORP, P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? **Obes Rev**, v. 2, n. 2, p. 73-86, May 2001. ISSN 1467-7881 (Print)1467-7881. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- BRUNSON, K. L. et al. Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. **J Neurosci**, United States, v. 25, n. 41, p. 9328-38, 2005. ISSN 1529-2401 (Electronic)0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.
- BUWALDA, B. et al. Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. **Physiol Behav**, v. 73, n. 3, p. 371-7, Jun 2001. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiol Behav**, United States, v. 79, n. 3, p. 359-71, 2003. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.
- CLINTON, S. M.; WATSON, S. J.; AKIL, H. High novelty-seeking rats are resilient to negative physiological effects of the early life stress. **Stress**, v. 17, n. 1, p. 97-107, Jan 2014. ISSN 1025-3890. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2013.850670>>.

COLMAN, J. B. et al. Variations in the neonatal environment modulate adult behavioral and brain responses to palatable food withdrawal in adult female rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 40, p. 70-5, Feb 2015. ISSN 0736-5748. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.003>>.

CUNHA, A. C. D. A. **O consumo crônico de "comfort-food" e comportamentos relacionados à ansiedade em ratos adultos submetidos ao estresse neonatal**. 2015. Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

D'ARGENIO, A. et al. Early trauma and adult obesity: is psychological dysfunction the mediating mechanism? **Physiol Behav**, v. 98, n. 5, p. 543-6, Dec 7 2009. ISSN 0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.08.010>>.

DALLE MOLLE, R. Estudo translacional sobre a qualidade do cuidado materno em resposta ao estresse neonatal, sua associação com ansiedade na vida adulta e investigação de potenciais mecanismos envolvidos. **Dissertação (Mestrado)**. 2011. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DALLE MOLLE, R. et al. Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. **Transl Psychiatry**, v. 2, p. e195, 2012. ISSN 2158-3188 (Electronic) 2158-3188 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23168995>>. Disponível em: <<http://www.nature.com/tp/journal/v2/n11/pdf/tp2012126a.pdf>>.

DALLMAN, M. F. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. **Trends Endocrinol Metab**, United States, v. 21, n. 3, p. 159-65, 2010. ISSN 1879-3061 (Electronic)1043-2760 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

DALLMAN, M. F. et al. Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1018, p. 141-50, Jun 2004. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1196/annals.1296.017>>.

_____. Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. **Endocrinology**, United States, v. 145, n. 6, p. 2633-8, 2004. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

_____. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 100, n. 20, p. 11696-701, 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

DALLMAN, M. F.; PECORARO, N. C.; LA FLEUR, S. E. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 4, p. 275-80, Jul 2005. ISSN 0889-1591 (Print)0889-1591. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2004.11.004>>.

DANESE, A. et al. Leptin deficiency in maltreated children. **Transl Psychiatry**, v. 4, p. e446, Sep 23 2014. ISSN 2158-3188. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/tp.2014.79>>.

DARNAUDERY, M.; MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain Res Rev**, v. 57, n. 2, p. 571-85, Mar 2008. ISSN 0165-0173 (Print)0165-0173. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.11.004>>.

DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflugers Arch**, v. 465, n. 5, p. 601-26, May 2013. ISSN 0031-6768. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1271-7>>.

ELY, D. R. et al. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. **Physiol Behav**, United States, v. 61, n. 3, p. 395-8, 1997. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

EPEL, E. et al. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. **Psychoneuroendocrinology**, England, v. 26, n. 1, p. 37-49, 2001. ISSN 0306-4530 (Print)0306-4530 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

FARRELL, M. R.; SENGELAUB, D. R.; WELLMAN, C. L. Sex differences and chronic stress effects on the neural circuitry underlying fear conditioning and extinction. **Physiol Behav**, v. 122, p. 208-15, Oct 2 2013. ISSN 0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.04.002>>.

FINGER, B. C.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. **Neuroscience**, v. 192, p. 351-60, Sep 29 2011. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.072>>.

FRIED, S.; RICCI, M.; RUSSELL, C. Symposium: Adipocyte function, differentiation and metabolism. **J Nutr**, v. 3122–3126, p. 3122–3126, 2000.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-70, Oct 22 1998. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/27376>>.

GARIEPY, G.; NITKA, D.; SCHMITZ, N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. **Int J Obes (Lond)**, v. 34, n. 3, p. 407-19, Mar 2010. ISSN 0307-0565. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.252>>.

GEORGE, S. A. et al. CRH-stimulated cortisol release and food intake in healthy, non-obese adults. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 607-12, May 2010. ISSN 0306-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.09.017>>.

HABIB, K. E.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology of stress. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 695-728; vii-viii, Sep 2001. ISSN 0889-8529 (Print)0889-8529. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

HAN, Q. Q. et al. Differential GR Expression and Translocation in the Hippocampus Mediates Susceptibility vs. Resilience to Chronic Social Defeat Stress. **Front Neurosci**, v. 11, p. 287, 2017. ISSN 1662-4548 (Print)1662-453x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2017.00287>>.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci**, England, v. 20, n. 2, p. 78-84, 1997. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

HERMAN, J. P. et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Front Neuroendocrinol**, United States, v. 24, n. 3, p. 151-80, 2003. ISSN 0091-3022 (Print)0091-3022 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

_____. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. **Compr Physiol**, v. 6, n. 2, p. 603-21, Mar 15 2016. ISSN 2040-4603. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c150015>>.

HRYHORCZUK, C. et al. Saturated high-fat feeding independent of obesity alters hypothalamus-pituitary-adrenal axis function but not anxiety-like behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 83, p.

142-149, Sep 2017. ISSN 0306-4530. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.06.002>.

Institute of Medicine (IOM). Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, DC: The National Academies Press; 2005.

IVY, A. S. et al. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. **Neuroscience**, United States, v. 154, n. 3, p. 1132-42, 2008. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

KAMARA, K.; ESKAY, R.; CASTONGUAY, T. High-fat diets and stress responsivity. **Physiol Behav**, v. 64, n. 1, p. 1-6, Apr 1998. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: <http://dx.doi.org/>.

KAUFMAN, J. et al. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. **Biol Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 778-90, Oct 15 2000. ISSN 0006-3223 (Print)0006-3223. Disponível em: <http://dx.doi.org/>.

KELESIDIS, T.; MANTZOROS, C. S. The emerging role of leptin in humans. **Pediatr Endocrinol Rev**, v. 3, n. 3, p. 239-48, Mar 2006. ISSN 1565-4753 (Print)1565-4753. Disponível em: <http://dx.doi.org/>.

KIM, J. Y. et al. Beneficial Effects of Highly Palatable Food on the Behavioral and Neural Adversities induced by Early Life Stress Experience in Female Rats. **Int J Biol Sci**, v. 11, n. 10, p. 1150-9, 2015. ISSN 1449-2288. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.12044>.

KUHLMAN, K. R. et al. Differential associations between childhood trauma subtypes and adolescent HPA-axis functioning. **Psychoneuroendocrinology**, v. 54, p. 103-14, Apr 2015. ISSN 0306-4530. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.020>.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659-62, Sep 12 1997. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287218>.

LUBIS, A. R. et al. The role of SOCS-3 protein in leptin resistance and obesity. **Acta Med Indones**, v. 40, n. 2, p. 89-95, Apr 2008. ISSN 0125-9326 (Print)0125-9326. Disponível em: <http://dx.doi.org/>.

MACHADO, T. D. et al. Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for "comfort foods" in adult female rats. **Stress**, v. 16, n. 5, p. 549-56, Sep 2013. ISSN 1607-8888 (Electronic)1025-3890 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781957>

MACHADO, T. D.; DALLE MOLLE, R.; SILVEIRA, P. P. Alterations in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in animals submitted to early-life trauma. **Clin Biomed Res.**, v. 37, n. 3, p. 169-174, 2017-09-29 2017. Disponível em: <http://www.seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/73266/pdf>.

MANIAM, J. et al. A diet high in fat and sugar reverses anxiety-like behaviour induced by limited nesting in male rats: Impacts on hippocampal markers. **Psychoneuroendocrinology**, v. 68, p. 202-9, Jun 2016. ISSN 0306-4530. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.03.007>.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 10, p. 1553-64, Nov 2010. ISSN 0306-4530. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.05.012>.

MARTI, O.; MARTI, J.; ARMARIO, A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. **Physiol Behav**, v. 55, n. 4, p. 747-53, Apr 1994. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

MATHENY, M. et al. Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 2-3, p. 480-7, Feb-Mar 2011. ISSN 0028-3908. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.11.002>>.

MCEUEN, J. G. et al. Influence of sex and corticotropin-releasing factor pathways as determinants in serotonin sensitivity. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3709-16, Aug 2009. ISSN 0013-7227. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-1721>>.

MCLAUGHLIN, K. A. et al. Childhood social environment, emotional reactivity to stress, and mood and anxiety disorders across the life course. **Depress Anxiety**, v. 27, n. 12, p. 1087-94, Dec 2010. ISSN 1520-6394 (Electronic)1091-4269 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/da.20762>>.

_____. Causal effects of the early caregiving environment on development of stress response systems in children. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 112, n. 18, p. 5637-42, 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic)0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1423363112>>.

MCNEILLY, A. D. et al. High fat feeding is associated with stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and reduced anxiety in the rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 272-80, Feb 2015. ISSN 0306-4530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.12.002>>.

MEANEY, M. J. et al. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. **J Neurosci**, v. 20, n. 10, p. 3926-35, May 15 2000. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

MOLET, J. et al. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. **Dev Psychobiol**, v. 56, n. 8, p. 1675-88, Dec 2014. ISSN 0012-1630. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/dev.21230>>.

MORATO, S.; PAULO, U. S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 159-174, 00/2006 2006. ISSN 0103-6564. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S010365642006000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

MORICEAU, S. et al. Early-life stress disrupts attachment learning: the role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, and olfactory bulb norepinephrine. **J Neurosci**, v. 29, n. 50, p. 15745-55, Dec 16 2009. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4106-09.2009>>.

MORRIS, M. J. et al. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**, Dec 10 2014. ISSN 0149-7634. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.002>>.

MURRAY, S. et al. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 9, p. 540-52, Sep 2014. ISSN 1759-5029. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.91>>.

NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Disponível em: <<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2014.

NOLTE, T. et al. Interpersonal stress regulation and the development of anxiety disorders: an attachment-based developmental framework. **Front Behav Neurosci**, v. 5, p. 55, 2011. ISSN 1662-5153 (Electronic)1662-5153 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960962>>.

ORTOLANI, D. et al. Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. **Physiol Behav**, v. 103, n. 5, p. 487-92, Jul 6 2011. ISSN 0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.028>>.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: application of tables in nutritional studies. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 6, p. 741-760, 12/2006 2006. ISSN 1415-5273. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S141552732006000600010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

PANAGIOTAROPOULOS, T. et al. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. **Neuroendocrinology**, Switzerland, v. 79, n. 2, p. 109-18, 2004. ISSN 0028-3835 (Print)0028-3835 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

PAPALE, L. A. et al. Early-life stress links 5-hydroxymethylcytosine to anxiety-related behaviors. **Epigenetics**, v. 12, n. 4, p. 264-276, Apr 3 2017. ISSN 1559-2294. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2017.1285986>>.

PARFITT, D. B. et al. Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. **Brain Res**, v. 1016, n. 1, p. 111-8, Jul 30 2004. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.04.077>>.

PATCHEV, A. V. et al. The future is now: early life events preset adult behaviour. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 1, p. 46-57, Jan 2014. ISSN 1748-1708. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/apha.12140>>.

PAXINOS, G. E.; WATSON, C. H. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates** Sixth edition. Elsevier, 2007. 456.

PECORARO, N. et al. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. **Endocrinology**, United States, v. 145, n. 8, p. 3754-62, 2004. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

PIRES, G. N.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Relationship between sleep deprivation and anxiety--experimental research perspective. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 10, n. 4, p. 519-23, Oct-Dec 2012. ISSN 1679-4508. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

PLOTSKY, P. M. et al. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. **Neuropsychopharmacology**, United States, v. 30, n. 12, p. 2192-204, 2005. ISSN 0893-133X (Print)0006-3223 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

PRASAD, A.; PRASAD, C. Short-term consumption of a diet rich in fat decreases anxiety response in adult male rats. **Physiol Behav**, v. 60, n. 3, p. 1039-42, Sep 1996. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

PRATLEY, R. E. et al. Insulin increases leptin mRNA expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in humans. **Mol Genet Metab**, v. 70, n. 1, p. 19-26, May 2000. ISSN 1096-7192 (Print)1096-7192. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/mgme.2000.2995>>.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 8, p. 1281-3, Mar 15 2004. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00963>>.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D. et al. Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0176554, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176554>>.

RICE, C. J. et al. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. **Endocrinology**, United States, v. 149, n. 10, p. 4892-900, 2008. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

SHARMA, S.; FERNANDES, M. F.; FULTON, S. Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 9, p. 1183-91, Sep 2013. ISSN 0307-0565. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2012.197>>.

SHARMA, S.; FULTON, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 3, p. 382-9, Mar 2013. ISSN 0307-0565. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2012.48>>.

SHIKANAI, H.; KIMURA, S.; TOGASHI, H. Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation. **Biol Pharm Bull**, v. 36, n. 9, p. 1392-5, 2013. ISSN 0918-6158. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

SILVEIRA, P. P. et al. Satiety assessment in neonatally handled rats. **Behav Brain Res**, Netherlands, v. 173, n. 2, p. 205-10, 2006. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

_____. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. **Int J Dev Neurosci**, England, v. 28, n. 1, p. 111-8, 2010. ISSN 1873-474X (Electronic)0736-5748 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

_____. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. **Physiol Behav**, v. 80, n. 5, p. 739-45, Feb 2004. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.12.009>>.

SIVANATHAN, S. et al. Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats. **Behav Brain Res**, v. 286, p. 265-70, Jun 1 2015. ISSN 0166-4328. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.036>>.

SOUZA CG et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sci**, v. 81, n.3, p. 198-203, 2007.

STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 4, n. 3, p. 231-49, Sep 2002. ISSN 1294-8322 (Print)1294-8322 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033741>>.

_____. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 13, n. 4, p. 495-506, 2011. ISSN 1294-8322 (Print)1294-8322 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22275854>>.

TARTAGLIA, L. A. The leptin receptor. v. 272, n. 10, p. 6093-6, 1997.

TOMIYAMA, A. J.; DALLMAN, M. F.; EPEL, E. S. Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. **Psychoneuroendocrinology**, England, v. 36, n. 10, p. 1513-9, 2011. ISSN 1873-3360 (Electronic)0306-4530 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

TOTTENHAM, N.; SHERIDAN, M. A. A review of adversity, the amygdala and the hippocampus: a consideration of developmental timing. **Front Hum Neurosci**, v. 3, p. 68, 2009. ISSN 1662-5161. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/neuro.09.068.2009>>.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 47, p. 20529-34, Nov 23 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007740107>>.

_____. Stress exposure, food intake and emotional state. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 381-99, 2015. ISSN 1025-3890. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2015.1062981>>.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun 2009. ISSN 1471-003x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn2647>>.

WEAVER, I. C. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nat Neurosci**, United States, v. 7, n. 8, p. 847-54, 2004. ISSN 1097-6256 (Print)1097-6256 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

WILSON, M. E. et al. Quantifying food intake in socially housed monkeys: social status effects on caloric consumption. **Physiol Behav**, v. 94, n. 4, p. 586-94, Jul 5 2008. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.03.019>>.

ZABEAU, L. et al. The ins and outs of leptin receptor activation. **FEBS Lett**, v. 546, n. 1, p. 45-50, Jul 3 2003. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

12. INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO SUBMETIDO

Esta dissertação de mestrado gerou um artigo científico que está em processo de publicação.