UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ANA CARLA DE ARAÚJO DA CUNHA

O CONSUMO CRÔNICO DE "*COMFORT FOOD*" E COMPORTAMENTOS RELACIONADOS Á ANSIEDADE EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE NEONATAL.

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
FACULDADE DE MEDICINA
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ANA CARLA DE ARAÚJO DA CUNHA

O CONSUMO CRÔNICO DE "*COMFORT FOOD*" E COMPORTAMENTOS RELACIONADOS Á ANSIEDADE EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE NEONATAL.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profª. Dra. Patricia Pelufo Silveira
Co- orientadora: Tania Diniz Machado

Porto alegre,2015

O CONSUMO CRÔNICO DE "*COMFORT FOOD*" E COMPORTAMENTOS RELACIONADOS Á ANSIEDADE EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE NEONATAL

Orientador: Profa. Drª. Patrícia Pelufo Silveira
Co- orientadora: Drª. Tania Diniz Machado

Banca Examinadora:

Profa. Drª Cristiane Matté
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Drª. Juliana R. Bernardi
Universidade de Caxias do Sul

Porto Alegre
2015

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo seu amor e cuidado com a minha vida, e por sempre realizar os sonhos do meu coração.

A minha mãe, **Doraçy Maria de Araújo** e ao meu esposo, **Cleber Luis S. Garcia** pelo zelo e amor dedicado a mim.

A minha orientadora, **Prof. Dra Patricia Pelufo Silveira** pelo exemplo de profissionalismo conduzindo seus alunos com carinho, e incentivo. Confiando a mim este trabalho.

A minha co-orientadora, **Drª. Tania Diniz Machado** pela paciência em, sempre, me explicar tudo. E, imprescindível colaboração para que este trabalho se concretizasse.

À amiga, Amanda Muceline por ter me apresentado ao grupo. E, em outrora, me inserindo na pesquisa aguçando meu desejo por continuar na iniciação cientifica.

A todos os integrantes do grupo DoHad pelo acolhimento e, colaboração, direta e indireta, neste trabalho.

A UFRGS que possibilitou a minha formação acadêmica.

"Aqueles que saíram, levando a semente para semear, voltarão cantando cheios de alegria, trazendo nos braços os feixes da colheita."

Salmos, 126:6

RESUMO

Palavras-chave: Estresse, ansiedade, comportamento alimentar.

Introdução: O estresse no início da vida altera a função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, aumenta a ansiedade e induz a ingestão de alimentos do tipo *"comfort foods*", ricos em gordura e ou açúcar, como forma de conforto. Objetivo deste trabalho foi verificar se o consumo crônico de alimento palatável poderia melhorar os sintomas de ansiedade (previamente descrito no modelo de trauma precoce) na vida adulta. Métodos: No dia 2 de vida as ninhadas de ratos Wistar foram submetidas ao estresse no inicio da vida (intervenção) com redução do material para a confecção do ninho ou tratamento padrão (Controles). O cuidado materno foi avaliado ao longo de 10 dias. Foi ofertado dois tipos derações: padrão e rica em gordura (34%) e açúcar (20%) na idade adulta. A ansiedade foi avaliada usando o labirinto em cruz elevado (PM), e a corticosterona foi medida por teste de estresse por contenção de movimentos nos tempos 0 e 20, 40, 60 e 90 min. Resultados: As genitoras do grupo intervenção apresentaram menor comportamento de lambidas (LG-licking and grooming) comparado ao grupo controle ($p = 0,020$). Durante as semanas de exposição ao "*comfort food*", não houve diferenças: no peso corporal ($p = 0,097$), no consumo de dieta padrão ($p=0,539$) e palatável ($p=0,426$), no peso das adrenais ($p=0,86$), no teste de labirinto em cruz elevado ($p = 0,056$) e nos níveis de corticosterona ($p = 0,596$), entre os grupos controle e intervenção. No entanto, os animais do grupo intervenção tiveram maior acúmulo de gordura abdominal ($p = 0,017$). Conclusão: O consumo crônico de "*comfort food*" é utilizado pelos animais do grupo intervenção para atenuar os sintomas de ansiedade.

ABSTRACT

Introduction: Stress early in life alters the function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, increases anxiety and induces intake of palatable food "comfort foods" like comfort food. Objective of this study was to determine whether the chronic consumption of palatable food could improve the symptoms of anxiety in adulthood. Methods: By the day 2 of life litters of Wistar rat were subjected to stress early in life (intervention) with reduced nesting of the cooking material or standard care (controls). The male rats were fed with two types of food: standard chow and comfort food rich in fat (34%) and sugar (20%) at adulthood. Anxiety was evaluated using the Pluz Maze, and corticosterone was measured by testing cotenção movements in time 0, 20, 40, 60 and 90 min. Results: Females in the intervention group showed less behavioral licks (LG-licking and grooming) compared to the control group p = 0.020. During the weeks of exposure to "comfort food", there were no differences: body weight (p = 0.097), the consumption of diets chow (0.539) and palatable (0.426) in adrenal weight (p = 0.86) in the Pluz maze test (p = 0.056) and corticosterone levels to acute restraint stress (p = 0.596) between control and intervention groups. However, the animals in the intervention group accumulate more abdominal fat (p = 0.017). Conclusion: Chronic use of "comfort food" is used by animals intervention to alleviate the symptoms of anxiety.

Palavras-chave: Stress, anxiety, feeding behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estresse e a glândula supra-renal. Esquema demonstrando a resposta do organismo ao estresse de curto e longo prazo. 13

Figura 2- Esquema mostrando a distribuição das ninhadas nos diferentes experimentos realizados. 24

Figura 3 - Desenho experimental..... 25

Figura 4 - Grupo controle neonatal. Fonte: Machado 2012. 26

Figura 5 - Grupo intervenção neonatal. Fonte: Machado 2012. 26

Figura 6 - Posturas de amamentação. A linha representa o ventre da genitora visto lateralmente, e os círculos representam os filhotes A) postura 4; B) postura 3; C) postura 2; D) postura 1 e E) postura passiva. Fonte: Machado 2012. 28

Figura 8 - Peso corporal, ao longo de 6 semanas, após o desmame, nos machos (n=8), machos intervenção(n=10). Dados expressos em média ± EP . ANOVA de medidas repetidas não mostrou interação entre tempo e grupo neonatal (p=0,945), somente efeito isolado do tempo. 33

Figura 9 - 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 ± EP. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou e efeito isolado do tempo (p<0,0001). 34

Figura 10 - Consumo de ração padrão ao longo de 7 semanas. ANOVA de medidas repetidas demonstrou que não houve interação entre tempo e grupo neonatal (p=0,539) somente efeito isolado do tempo p<0,0001.Grupos controle (n= 3 caixas) intervenção (n=3 caixas). Valores expressos em média ± EP. 37

Figura 11 - Consumo dieta palatável ao longo de 7 semanas. ANOVA de medidas repetidas demostrou efeito isolado do tempo p=0,025 sem interação entre grupo neonatal e tempo

p=0,426. Grupos controle (n=3 caixas) e intervenção (n= 3 caixas). Valores expressos em média ± EP. 37

Figura 12 – Peso das adrenais. ANOVA de uma via usando o peso corporal como co-variável; valores expressos em média ± EP; não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, p=0,086. 38

Figura 13 - Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimentos nos machos controles (n= 8) e machos intervenção (n=10). O período de exposição ao estresse por restrição de movimentos conpreende o intervado de tempo (T0´ ao T. 20´). Dados espressos em média ± EP; Teste A análise por Equações de Estimação Generalizadas demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos, p=0, 327. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre as médias das variáveis relacionadas com o cuidado materno. 32

Tabela 2 - Percentual de gordura abdominal conforme grupo neonatal..... 35

Tabela 3 - Variáveis analisadas no teste do labirinto em cruz elevado, conforme o grupo neonatal..... 36

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CRF	Fator liberador de corticotrofina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
LG	*Licking and grooming* – lamber os filhotes
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
Rpm	Rotações por minuto
SPSS	*Statistical Package for the Social Sciences*
UEA	Unidade de Experimentação Animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 REVISÃO DA LITERATURA 12

2.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPOFISE- ADRENAL (HPA) 12

2.2 ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA 14

2.3 ANSIEDADE 16

2.4 OBESIDADE E ALIMENTOS CONFORTANTES "COMFORT FOODS" 18

3 JUSTIFICATIVA 21

4 OBJETIVOS 22

4.1 OBJETIVO GERAL 22

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22

5 METODOLOGIA 23

5.1 ESTUDO EXPERIMENTAL 23

5.1.1 Animais 23

5.1.2 Grupos Neonatal 25

5.1.3 Observações do cuidado materno 26

5.1.4 Avaliação do ganho de peso corporal 28

5.1.5 Subdivisão dos grupos neonatais em diferentes dietas 29

5.1.6 Teste do labirinto em cruz elevado 29

5.1.7 Estresse por contenção de movimento 30

5.1.8 Coleta de material biológico 30

5.1.9 Análise Bioquímicas 30

5.2 ANÁLISES ESTATISTICAS 30

5.3 ASPECTOS ÉTICOS 31

5.4 DESCARTE DE RESIDUOS 31

6 RESULTADOS 32

6.1 GRUPO CONTROLE E INTERVENÇÃO 32

6.1.1 Cuidado materno 32

6.1.2 Peso corporal ao longo das primeiras 6 semanas após o desmame 33

6.1.3 Peso Corporal ao longo de 7 semanas de dieta 33

6.1.4 Gordura abdominal 34

6.1.5 Teste labirinto em cruz elevado.....35
6.1.6 Consumo de ração padrão ao longo das 7 semanas.....36
6.1.7 Consumo de palatável ao longo das 7 semanas.....37
6.1.8 Peso das adrenais.....38
6.1.9 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por cotenção de movimento. 38
7 DISCUSSÃO.....40
8 CONCLUSÃO.....45
9 REFERENCIAS.....46

1 INTRODUÇÃO

O estresse pode ser definido como uma reação do organismo a uma ameaça, real ou potencial. Dessa forma, o organismo visando reestabelecer o equilíbrio interno, ativa um conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais, que são mediadas pelo sistema nervoso autônomo e eixo hipotálamo hipófise adrenais (HPA) (CHARMANDARI *et al.,* 2005). Os glicocorticoides, cortisol em seres humanos e corticosterona em ratos são efetores finais do eixo HPA que é o principal sistema envolvido na resposta cronica ao estresse. Muitos trabalhos relacionam a hiperativação do HPA com ansiedade, transtornos de humor, episódios depressivos, transtornos alimentares e doenças psiquiátricas (JURUENA *et al.,* 2004). Tem sido bem demonstrado na literatura que intervenções precoces estão associadas a alterações no sistema neuroendócrino em roedores (PLOTSKY *et al.,* 2005; BENETTI *et al.,* 2014) e humanos (TURECKI; MEANEY, 2014). Especificamente porque a fase inicial da vida é acompanhada por alta plasticidade e vulnerabilbidade cerebral, caracterizando a adversidade no ambiente neonatal um potente programador do eixo HPA. Alterações no cuidado materno como negligência ou, experiências desfavoráveis como abuso físico e emocional promovem mudanças epigenéticas, além de alterações comportamentais e fisiológicas que podem permanecer na vida adulta (TURECKI; MEANEY, 2014))

Em roedores a alteração do ambiente neonatal, através da limitação do material para confecção do ninho, leva a instabilidade do cuidado materno, o que promove na vida adulta alterações da resposta neuroendócrina ao estresse (AVISHAI-ELINER *et al.,* 2001). Resultando em maiores níveis de corticosterona basal e ansiedade na fase adulta (DALLE MOLLE *et al.,* 2012). Estudos demostram que ratos submetidos ao estresse neonatal tiveram maior preferência por alimentos açucarados e gordurosos, os "*comfort foods*". Da mesma forma outros estudos demontraram associação entre consumo de "*comfort food"* e menores níveis basal de glicocorticoides levando a atenuação da atividade do eixo HPA (PECORARO *et al.,* 2004; SILVEIRA *et al.,* 2010; TOMIYAMA *et al.,* 2011). Contudo, na literatura muitos estudam a relação entre consumo de alimentos do tipo "*comfort food"* associando com situações de estresse na vida adulta. Porém pouco se sabe sobre a relação entre consumo do alimento tipo "*comfort food*", na vida adulta, induzido pelo trauma vivenciado na vida precoce e a alterações do eixo HPA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPOFISE- ADRENAL (HPA)

A resposta do organismo de ordem fisiológica frente ao estresse envolve o reflexo de luta ou fuga, uma resposta mais imediata ao agente agressor, com a ativação do sistema nervoso simpático e liberação de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguinea pela medula adrenal e nervos simpáticos respectivamente (HABIB *et al.*, 2001). E também ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), levando a liberação de glicocorticoides (cortisol nos seres humanos e corticosterona nos roedores) na corrente sanguínea (HABIB *et al.*, 2001). Os glicocorticoides são secretados pelo córtex adrenal e desempenham papel importante no metabolismo energético e regulam processos fisiológicos, incluindo a atividade do sistema imune (JURUENA *et al.,* 2004).

A exposição ao estressor, num primeiro momento, ativa a divisão simpática do sistema nervoso autonomperiférico. Este, através da inervação em órgãos alvos e medula adrenal, promovem alterações nos sistemas fisiológicos, aumentando em segundos a frequência cardíaca, redistribuindo do fluxo sanguineo e promovendo a mobilização de energia. Por outro lado o estresse ativa também os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo a secretar o hormônio liberador de corticotropina (CRH) na circulação porta hipofisária. Esse hormônio estimula a glândula pituitária anterior promovendo a liberação de adrenocorticotrofina (ACTH) na corrente sanguínea, que por sua vez vai estimular o córtex da glândula adrenal a sintetizar e liberar glicocorticoides (MAKINO et al., 2002; ULRICH-LAI; HERMAN, 2012; MCEWEN et al., 2015). Desse modo o CRH têm sido fortemente associado à responsividade do eixo HPA e das respostas comportamentais ao estresse (PLOTSKY *et al.,* 2005). (Figura 1)

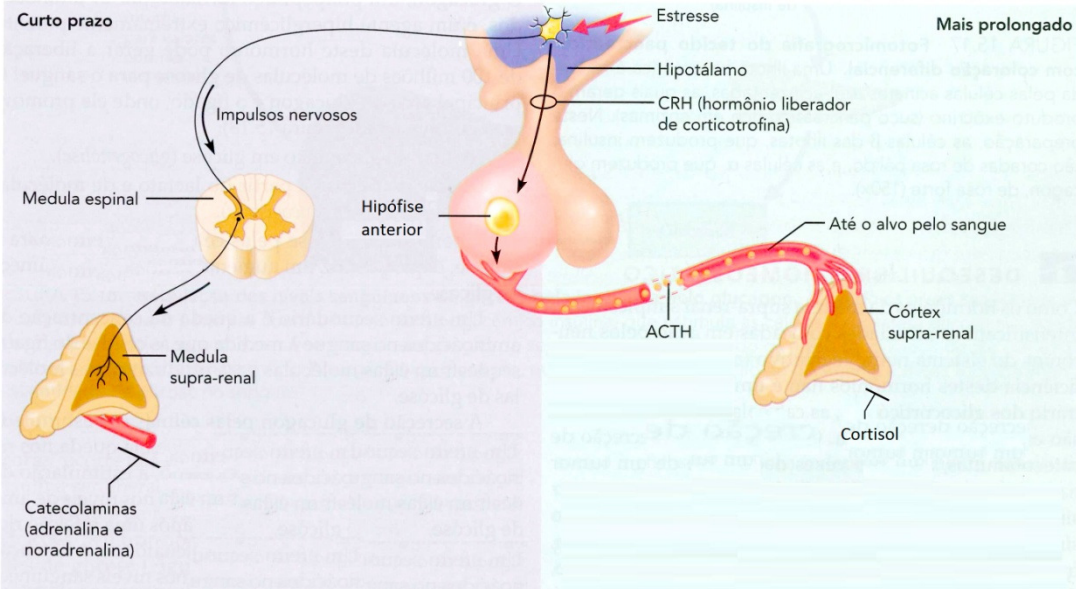

Figura 1- Estresse e a glândula supra-renal. Esquema demonstrando a resposta do organismo ao estresse de curto e longo prazo.

Fonte: Adaptado de Marieb. Anatomia e Fisiologia. 3ª Edição, 2009.

Embora certos níveis de cortisol sejam necessários para que as catecolaminas exerçam efeitos sobre outros sistemas do organismo, níveis elevados de cortisol afetam o funcionamento do eixo HPA. A incapacidade dos glicocorticoides exercerem sua retroalimentação negativa leva a um aumento nos níveis de cortisol na circulação. Em um estresse agudo os glicocorticoides desempenham facilmente a tarefa de retroalimentação com ação inibitória sobre a glandula pituitária, o hipocampo e o hipotálamo, diminuindo sua secreção. Contudo quando o estresse é prolongado, existem alterações nestas estruturas e essa inibição exercida pelos glicocorticoides não é tão eficiente, dessa forma, altos níveis circulantes de glicocorticoides continuam presentes, bem como a secreção de ACTH. Em longo prazo, a ação dos glicocorticoides no cérebro permite uma resposta modificada ao estresse, resultando em uma série de alterações metabólicas e comportamentais, como uma acentuada preferência pela ingestão de sacarose e gorduras. (DALLMAN *et al.,* 2003).

Muitos trabalhos relacionam a hiperativação do eixo HPA com ansiedade, transtornos de humor, episódios depressivos, transtornos alimentares e doenças psiquiátricas (NESTLER *et al.,* 2002; JURUENA *et al.,* 2004; HABIB *et al.,* 2001; JAHNG, 2011). Fatores psicológicos e sociais estão entre os mais poderosos estressores e potentes ativadores do eixo HPA (MCEWEN, 2000). Respostas fisiológicas e comportamentais são interpretadas pelo

cérebro que reage ao estressor alterando o funcionamento deste orgão. Contudo, alguns sistemas do organismo (cardiovascular, metabólico, imunitário) também apresentam alterações no funcionamento (BARR *et al.*, 2004).

No estresse crônico o cérebro passa por mudanças adaptativas, em que hormônios sistêmicos e neurotransmissores locais interagem para produzir alterações estruturais e funcionais, podendo contribuir para redução de funções cognitivas e danos cerebrais. A ativação anormal do sistema de resposta ao estresse em períodos de maior plasticidade cerebral como intra útero, pós-natal, infância e adolescência pode promover consequências consideráveis sobre a sua função; resultando, em longo prazo, predisposição a ansiedade, depressão e doenças associadas ao estresse (MCEWEN, 2000; HABIB KALMAL E., GOLD PHILIP W., 2001).

2.2 ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA

O estresse pode ser definido como uma resposta adaptativa do organismo a eventos considerados estressores, podendo estes ser físicos ou emocionais (JHONSON *et al.,* 1990). De acordo com Chrousos, os estressores físicos incluem perturbações do meio interno como anorexia e hipoglicemia e meio externo como temperaturas, injurias dentre outros (JHONSON *et al.,* 1990). O organismo reage ao estresse através de ajustes neuroquímicos, metabólicos, e comportamentais visando reestabelecer seu equilíbrio, como foi descritos em 1900 por Walter Canon pela reação de “luta ou fuga” (CANNON, 1913). Mais tarde em 1936 Selye apresentou o conceito de “Síndrome de Adaptação Geral” que se trata de um conjunto de reações orgânicas generalizadas e inespecíficas em resposta a estímulos aversivos, que passa por fases de resistência, hipertrofia adrenal, úlceras gástricas e diminuição dos órgãos do sistema imune (SELYE, 1998).

O estresse crônico no inicio da vida está relacionado a alterações fisiológicas persistentes (exemplo: metabolismo, crescimento, reprodução e resposta inflamatória), cognitivas, emocionais e funções cerebrais em longo prazo. Esse tipo de estresse em períodos de alta plasticidade e vulnerabilidade pode levar a alterações no eixo HPA promovendo mudanças no comportamento que podem permanecer na vida adulta. Tais achados são demonstrados tanto em humanos quanto em roedores. (PLOTSKY *et al.,* 2005; DARNAUDÉRY; MACCARI, 2008; MOLET *et al.,* 2014).

Abuso sexual, físico, emocional e negligência na infância estão entre as experiências adversas, neste período, capazes de ativar o hormônio liberador de corticotropina. De modo que, através de sua ação no HPA, torna-se o principal mecanismo que medeia à resposta ao estresse (VARGHESE *et al.*, 2015). Além disso, condições adversas neste período incluem a pobreza, abuso de substancias nocivas à saúde por parte da mãe, instabilidade dos pais e depressão materna, que estão associados ao desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta (MCLAUGHLIN *et al.,* 2011; MOLET *et al.*, 2014). Estudos em roedores e macacos demonstram que a qualidade do cuidado materno recebido na infância influencia a resposta do eixo HPA na vida adulta (TURECKI; MEANEY, 2014).

Em humanos, o processo de maturação do cérebro está parcialmente completo no momento do nascimento, continuando seu processo de desenvolvimento no período pós-natal até a adolescência. Em roedores o período de maior plasticidade cerebral, pós-natal, compreende os 21 dias após o nascimento, quando ocorre o desmame até o período da adolescência, 25-35 dias de vida (MOLET *et al.,* 2014).

Pessoas que se suicidaram e haviam passado pela traumática experiência de abuso na infância apresentaram redução significativa na expressão total de receptores de glicocorticoides no hipocampo quando comparados com vítimas de suicídio não abusadas e, com os controles (MCGOWAN *et al.,* 2009). Corroborando com os estudos em roedores que demonstram uma forte associação entre a adversidade ambiental no inicio da vida e alterações epigenéticas em resposta ao estresse (WEAVER *et al.*, 2004; MCGOWAN *et al.,* 2009; TURECKI; MEANEY, 2014). Logo tão cedo na primeira infância é visto que bebês cujas mães são deprimidas apresentam maiores níveis de cortisol quando comparados ao grupo controle (MOTTA *et al.,* 2005). Seguindo na mesma perspectiva outro estudo encontrou resultados similares ao descrito acima em bebês cujas mães tinham afastamento emocional intencional. Interessantemente os níveis de cortisol aumentavam quando exisistia afastamento não intencional da mãe (exemplo: depressão materna) em relação ao filho. Na depressão, a ausência emocional e o comportamento intrusivo da mãe causam danos ao bebê favorecendo situações de abuso ou negligência (MOTTA *et al.*, 2005).

Em roedores, o ambiente é modulado pelos cuidados maternos, variações neste ambiente, no inicio da vida, revelam alterações importantes e persistentes na expressão genes, através dos mecanismos epigenéticos, incluindo alteração na metilação de DNA (TURECKI; MEANEY, 2014). Nestes animais um comportamento materno importante para o

desenvolvimento da prole é a frequência de lambidas (LG) e da posição arqueada para amamentação. Na idade adulta os filhotes de mães com alto padrão de LG apresentam menor comportamento de medo e resposta mais atenuadas ao estresse em comparação com a prole de mães com baixo padrão de LG (WEAVER *et al.,* 2004).

Em roedores o estresse no período gestacional induz a ansiedade e depressão das proles na idade adulta (DARNAUDÉRY; MACCARI, 2008). Da mesma forma estudos experimentais demonstram que o trauma durante o período neonatal pode trazer mudanças no comportamento materno, alterando, inclusive, comportamento dos filhotes na vida adulta em relação à ansiedade.

Características de um cuidado maternal imprevisível e fragmentado ocorre em casos de negligência e abuso. Da mesma forma, ambientes que simulam vulnerabilidade social, são estressores para relação mãe-filhote resultando em comportamento materno anormal. É descrito na literatura um modelo experimental consistente que mimetiza situações de abuso e negligência. 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. Esse ambiente hostil e estressor impossibilita a mãe de construir o ninho reduzindo a qualidade geral dos seus cuidados com a prole (AVISHAI-ELINER *et al.,* 2001; IVY *et al.,* 2008; DALLE MOLLE *et al.,* 2012; BARAM *et al.,* 2013; MACHADO *et al.,* 2013; MOLET *et al.,* 2014). Como resultado esses animais apresentam comprometimento da memória, aumento de corticosterona basal, aumento do peso adrenal e diminuição dos receptores de glicocorticoides (BRUNSON *et al.*, 2005; MOLET *et al.,* 2014). Contudo, fêmeas que passaram por esse trauma neonatal apresentam secreção de corticosterona diferenciada (maior responsividade) em resposta ao estresse além de comportamento do tipo ansioso vida adulta (MACHADO *et al.,* 2013), também visto em machos (DALLE MOLLE *et al.*, 2012).

2.3 ANSIEDADE

A ansiedade é um estado emocional, acompanhado por mudanças fisiológicas e comportamentais, caracterizada por uma resposta generalizada para uma ameaça desconhecida ou um conflito interno. Mudanças no padrão de comportamento e ativação autonômica e neuroendócrina são formas de adaptação e preparam o organismo para estresse

futuros. No entanto quando essa forma de adaptação não é bem sucedida a ansiedade pode levar a dificuldade em lidar com desafios ou eventos estressantes do dia a dia (STEIMER, 2002, 2011). Eventos traumáticos, principalmente nos primeiros anos de vida, podem induzir a transtornos de ansiedade e depressão (BARAM *et al.,* 2013). Estudos têm demonstrado que indivíduos que passaram por maus tratos e outros traumas, bem como crianças e adultos com transtornos de humor e ansiedade apresentam uma resposta emocional elevada para eventos diários (MCLAUGHLIN *et al.,* 2011). Em roedores, estudos demostram que o estresse no inicio da vida leva a comportamento de ansiedade, depressão e dificuldades de aprendizado na vida adulta (SHIKANAI *et al.,* 2013).

Existe uma alta prevalência de transtornos de ansiedade em crianças e adolescentes (NOLTE *et al.,* 2011) sendo este, o transtorno psiquiátrico mais comum no mundo inteiro afetando um quarto da população em todas as faixas etárias. Geralmente transtornos de ansiedade são crônicos, além disso, estão associados a desfechos prejudiciais a saúde, como má qualidade de vida (GARIEPY *et al.,* 2010), depressão (NOLTE *et al.*, 2011) e mortalidade. (GARIEPY *et al.*, 2010).

Fatores genéticos e ambientais parecem interagir para resultar em fenótipos de transtornos de ansiedade, porém tem-se relacionado a influencia dos genes-ambiente de acordo com a etapa de desenvolvimento do individuo, sendo o ambiente no inicio da vida o fator de maior variância. Variações genéticas têm sido associadas com sensibilidade a ansiedade, porém apenas na presença de maus tratos na infância. (NOLTE *et al.,* 2011). Assim o cuidado materno fragmentado leva a um comportamento do tipo ansioso na prole e aumento da vulnerabilidade para comportamento depressivo em ratos logo após o desmame (BARAM *et al.,* 2013).

Existem diferenças entre os gêneros quanto a suceptibiidade a desenvolver doenças mentais relacionadas ao estresse. As mulheres apresentam maior incidência para transtornos de ansiedade e são duas vezes mais propensas a sofrer depresão, em relação aos homens (FARRELL *et al.*, 2013).

Em roedores estressados, na vida adulta, foi verificado efeitos na redução do comportamento do tipo ansioso quando expostos a dieta palatável. (PECORARO *et al.,* 2004; TOMIYAMA *et al.*, 2011). Alem disso, ratos machos alimentados, mesmo que por períodos

curtos, com dieta rica em gordura apresentam menor comportamento do tipo ansioso no teste de labirinto em cruz elevado (PRASAD; PRASAD, 1996).

2.4 OBESIDADE E ALIMENTOS CONFORTANTES "*COMFORT FOOD*"

Nas últimas décadas os países assistiram mudanças no perfil nutricional da população, que passou da desnutrição para obesidade, considerada entre as principais causas de morte evitável em todo o mundo (GENNÉ-BACON, 2014). O constante aumento de peso tem sido fator de risco para o desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis, com redução da qualidade de vida e mortalidade precoce (GESTA *et al.,* 2007; KNECHT *et al.,* 2008; GENNÉ-BACON, 2014). Nesse contexto, ainda no final da década de 90, a Organização Mundial da Saúde declarou formalmente a obesidade como uma epidemia mundial (CABALLERO, 2007).

Uma das abordagens utilizadas para diminuir a desnutrição no século 20 foi o aumento de energia por meio da adição de açúcar e gordura na dieta habitual (CABALLERO, 2007). Contudo hoje o consumo de energia proveniente de alimentos ricos nestes macronutrientes têm sido um dos principais contribuintes para ganho de peso e consequente obesidade. (COLMAN *et al.,* 2015). Além dos fatores ambientais, isto é, consumo excessivo de alimentos com alta densidade calórica e aumento da inatividade física (CABALLERO, 2007) contribuem também para a etiologia da obesidade os polimorfismos genéticos (GENNÉ-BACON, 2014), baixo peso ao nascer, (GENNÉ-BACON, 2014) e estresse no inicio da vida (D'ARGENIO *et al.*, 2009).

Dados recentes da Organização Mundial da saúde mostram que cerca de, 13% da população mundial adulta foram classificados como obesos, no ano de 2014. De acordo com as estimativas a obesidade em todo o mundo mais que dobrou de 1980 a 2014. No Brasil a obesidade também é um importante problema de saúde pública, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia, de acordo com a última POF (Pesquisa de Orçamentos Familiares – 2008/2009) 40,6% da população brasileira está acima do peso. E, dentro deste grupo, 10,5 milhões são obesos (OMS 2015 e IBGE). Políticas de saúde e diretrizes médicas abordam uma mudança no estilo de vida, para controle no avanço da obesidade, que consiste em redução da ingestão de calorias e aumento da atividade física. Porém estratégias como estas parecem não funcionar com todos os indivíduos. (GENNÉ-BACON, 2014).

Estudos têm mostrado uma associação significativa entre experiências estressantes nos primeiros anos de vida e o desenvolvimento de obesidade na vida adulta (ALVAREZ *et al*., 2007; D'ARGENIO *et al.,* 2009). Uma pesquisa realizada na Califórnia com 13.379 mulheres acima de 18 anos encontrou uma correlação positiva entre exposição ao abuso (físico ou sexual) no inicio da vida e propensão obesidade (ALVAREZ *et al.,* 2007). Outro estudo com obesos candidatos a cirurgia bariátrica encontrou resultado positivo para trauma no inicio da vida e aumento do risco de obesidade em comparação com o grupo controle e obesos que não passaram pelo trauma. Neste mesmo estudo quando realizada uma nova análise com exclusão de participantes que sofreram abuso físico ou sexual, os resultados não se alteraram, demonstrando que mesmo estressores emocionais menos graves no inicio da vida estão associados ao maior risco de obesidade na vida adulta (D'ARGENIO *et al.,* 2009).

O etresse crônico e os efeitos dos glicocorticóides no organismo induzem uma preferência por alimentos "*comfort food*". Roedores machos que foram expostos ao estresse crônico, apresentaram maior preferência por alimentos confortantes (PECORARO *et al.,* 2004). "*Comfort foods*" são alimentos ricos em açúcar e gordura considerados gratificantes e consumidos como medida de conforto para aliviar sintomas do estresse. (PECORARO *et al.,* 2004; DALLMAN, 2010). A preferência no consumo de alimentos confortantes independe do apetite e ingestão total de calorias (SILVEIRA *et al.,* 2006; DALLMAN, 2010) sendo percebido como forma de diminuir os níveis de 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 destes alimentos além das exigências homeostáticas. Isso infere o motivo pelo qual, o comportamento no consumo de alimentos palatáveis, assemelha-se ao comportamento de toxicodependência (MURRAY *et al.,* 2014; COLMAN *et al.,* 2015).

Durante o estresse, níveis elevados de glicocorticóides promovem mudanças metabólicas que levam a utilização de reservas energéticas, além de estimular a secreção de insulina. Isso favorece uma redistribuição das reservas corporais de energia, (DALLMAN *et al.,* 2003) promovendo a adiposidade abdominal (DALLMAN, 2010). Trabalhos abordam que a secreção dos glicocorticoides favorece o consumo de alimentos densos em energia, além de contribuir para deposição de gordura visceral, promovendo uma obesidade central (TOMIYAMA *et al.,* 2011). Roedores que apresentam respostas crônicas ao estresse, após consumo de dieta rica em açucar e gordura demonstram maior deposição gordura mesentérica e menor expressão CRH no núcleo paraventricular, além de menores níveis de corticosterona

(TOMIYAMA *et al.,* 2011). Dessa forma, sinais provenientes deste estado energético podem servir como um sinal de retroalimentação negativa diminuindo a ação do eixo HPA (DALLMAN, 2010).

A redução da atividade do eixo HPA induzido por alimentos confortantes assemelha-se á resposta de retroalimentação dos glicocorticoides sobre este eixo, dessa forma, os roedores utilizariam os alimentos palatáveis como "remédio" para regular as respostas ao estresse (PECORARO *et al.,* 2004; TOMIYAMA *et al.*, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

No modelo de trauma neonatal (diminuição do material disponível para a construção do ninho) foram vistas alterações neuroendócrinas que culminam com maiores níveis de corticosterona em roedores em resposta ao estresse. Além disso, esses animais na vida adulta apresentam comportamento do tipo ansioso e preferem alimento do tipo "*comfort food*". Tem-se demonstrado na literatura em diferentes modelos animais uma relação entre o estresse na vida adulta, níveis de cortisol, o consumo de "*comfort food"* e o acúmulo de gordura abdominal. Contudo, poucos exploram o modelo de trauma neonatal nesse contexto. No entanto, não se sabe se o uso crônico de "*comfort food*" é capaz de reverter os sintomas de ansiedade e reduzir os níveis de corticosterona em roedores machos submetidos ao trauma precoce. Desse modo, torna-se relevante explorar tal questão de pesquisa.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o uso crônico de "*comfort food*" em machos submetidos ambiente perinatal hostil (redução do material disponível para confeccionar o ninho) é capaz de reveter comportamento do tipo ansioso na vida adulta, assim como induzir menores níveis de corticosterona.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do comportamento maternal entre as genitoras dos grupos controle e intervenção.
- Avaliar o consumo alimentar das rações regular e palatável ao longo da vida.
- Avaliação do comportamento do tipo ansioso após a exposição crônica a dieta palatável, 7 semanas, através do teste labirinto em cruz elevada.
- Avaliar a resposta hormonal (corticosterona), após a exposição crônica a dieta palatável, ao teste de estresse por contenção de movimentos.
- Mensurar o acúmulo de gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal).

5 METODOLOGIA

5.1 ESTUDO EXPERIMENTAL

5.1.1 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 os animais 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 + 2º 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 46cm x 31cm x 16cm, com o assoalho recoberto com maravalha e mantidos no mesmo ambiente controlado conforme citado acima. No dia 21 de vida, os filhotes foram desmamados e separados por sexo, em 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 + 2º 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 1. O tamanho da ninhada variou de 4 a 13, mas a média do número de filhotes não foi diferente entre os grupos (média±DP – controle: 9,14±2,60 e intervenção: 9,85±2,19, p=0,589), sendo esta variável utilizada como co-variável em determinadas análises (ver "Análises Estatísticas"). 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.

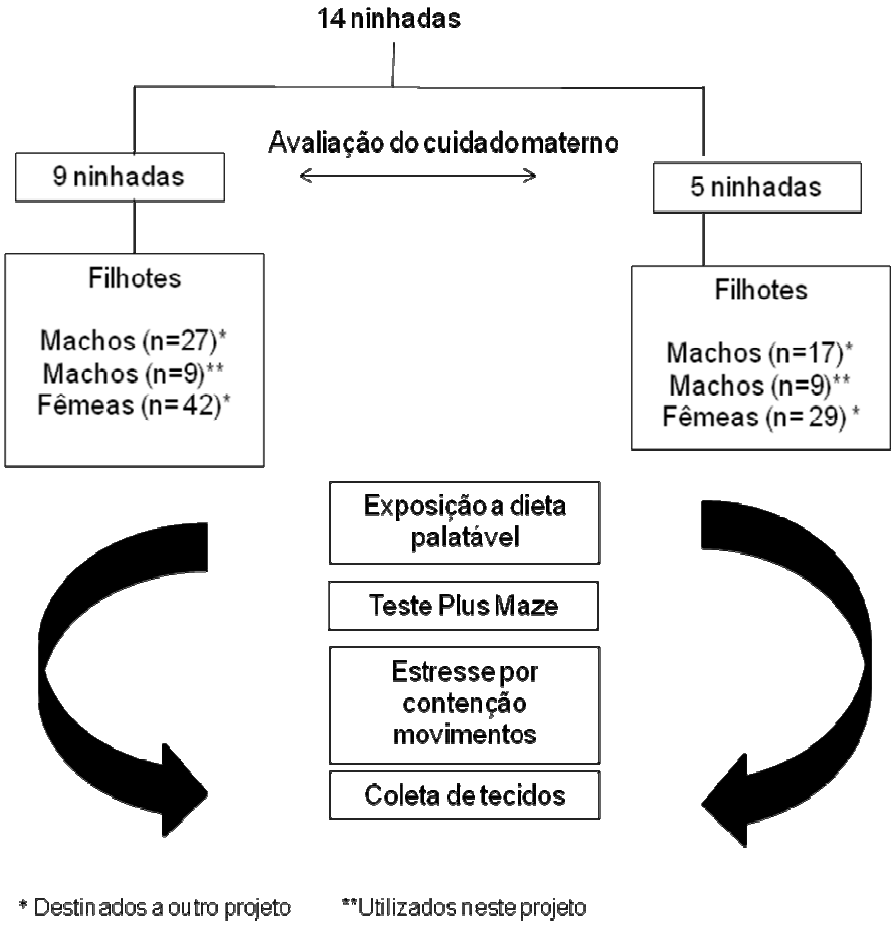

Figura 2- Esquema mostrando a distribuição das ninhadas nos diferentes experimentos realizados.

Ao completarem 60 dias de vida os roedores machos (controle e intervenção) passaram a receber a opção de novas dietas, regular epalatável e água *ad libitum.* Ambos os grupos receberam rações novas às quais não estavam acostumados até o fim da vida, portanto mesmo a ração regular era diferente da ração padrão consumida pelos animais até então. Isso foi feito para que todos os animais enfrentassem os efeitos da neofobia alimentar e portanto, esse viés pudesse ser diluído entre os diferentes grupos experimentais. Após sete semanas de tratamento, cada animal foi submetido ao teste de comportamento labirinto em cruz elevado, ao teste de estresse por contenção de movimento. Os testes foram realizados em salas comportamentais aclimatadas na UEA.

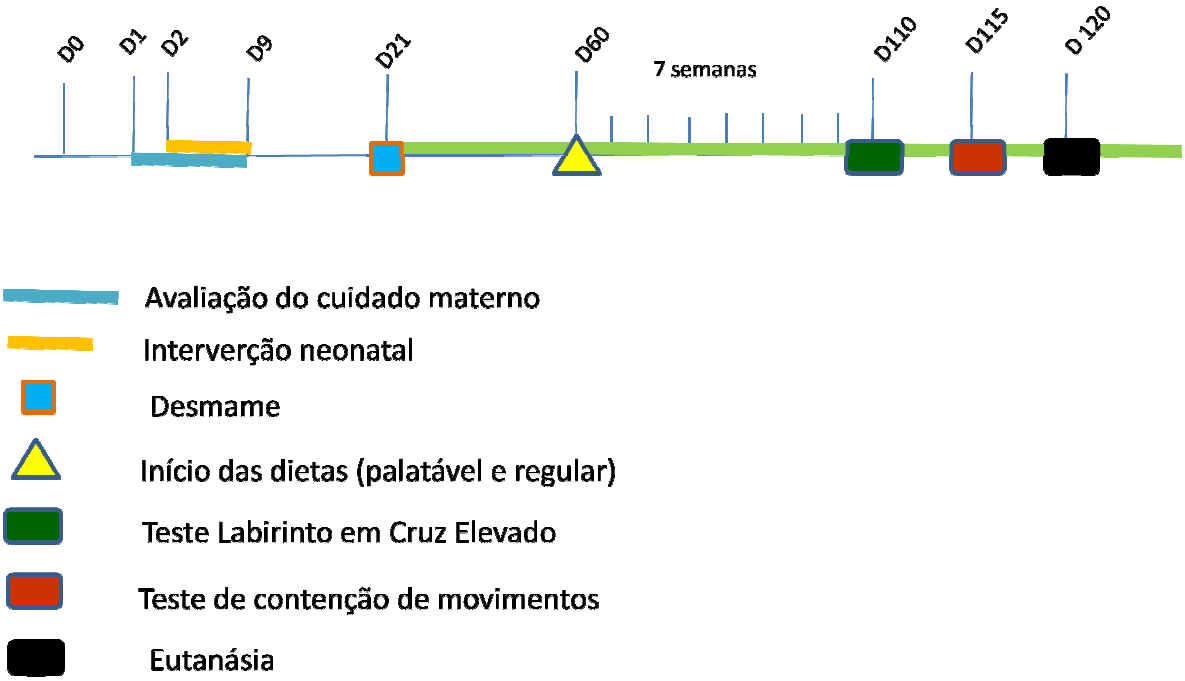

Figura 3 - Desenho experimental.

5.1.2 Grupos Neonatal

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

5.1.3 Observações do cuidado materno

Os procedimentos de avaliação do cuidado materno ocorreram na unidade de experimentação animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por integrantes do Grupo DOHAD.

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 observações/dia x 5 períodos/dia = 125 observações/genitora/dia), sendo que o observador registrava o comportamento que estava acontecendo no instante em que ele olhava para os animais (ou seja, como se o observador tirasse uma fotografia do que estava acontecendo exatamente no instante da observação). Os seguintes comportamentos maternais foram registrados:

a) Genitora em contato com os filhotes – no mínimo 3 filhotes.

b) Genitora fora do ninho.

c) Genitora amamentando os filhotes, conforme a posição do dorso arqueado: (1), (2), (3) ou (4); sendo a posição (1) a menos arqueada e a posição (4) a mais arqueada.

d) Genitora amamentando os filhotes de forma passiva, ou seja, quando ela está deitada de costas ou de lado ao amamentar.

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

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

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

As posturas de amamentação são classificadas conforme a posição do dorso arqueado. Na posição 4, a genitora está imóvel e numa postura de alto arqueamento dorsal, apoiada por patas dianteiras e traseiras rígidas e a cabeça baixa, com o tronco e membros simétricos bilateralmente. A maioria ou todos os filhotes estão sendo amamentados. As posições 3 e 2 são posturas progressivamente menos intensas da posição 4 (ver figura 5); nesses casos, a genitora está sobre os filhotes, relativamente imóvel, membros colocados de forma simétrica bilateralmente, com a cabeça na posição de repouso (não baixa) numa postura de arqueamento

dorsal baixo apoiada por patas dianteiras **e** traseiras rígidas (posição 3) ou numa postura de arqueamento dorsal baixo apoiada por patas dianteiras ou traseiras rígidas (posição 2). Na posição 1, a genitora se coloca sobre os filhotes sem arqueamento dorsal com pouco ou nenhum apoio de membros. Na posição passiva, a genitora está amamentando um ou mais filhotes deitada com o ventre para cima ou de lado (LONSTEIN *et al.,* 1998; PRYCE *et al.,* 2001).

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

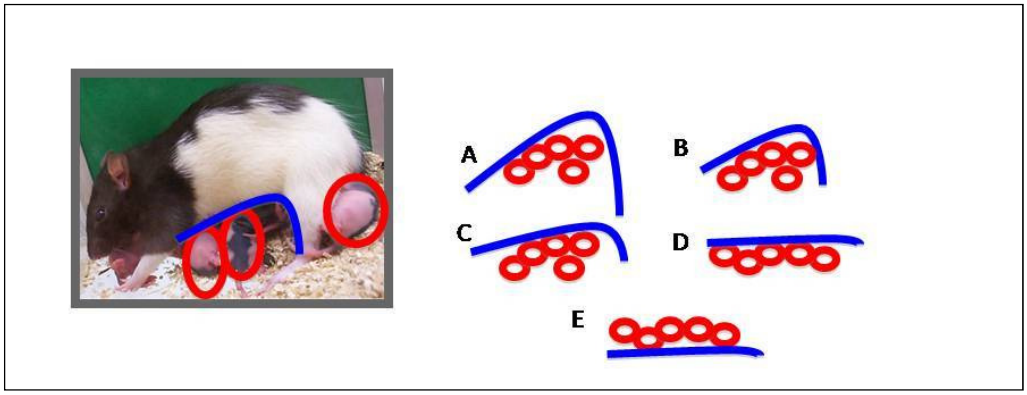

Figura 6 - Posturas de amamentação. A linha representa o ventre da genitora visto lateralmente, e os círculos representam os filhotes A) postura 4; B) postura 3; C) postura 2; D) postura 1 e E) postura passiva.

Fonte: Machado 2012.

5.1.4 Avaliação do ganho de peso corporal

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

5.1.5 Subdivisão dos grupos neonatais em diferentes dietas

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

a) Controle com dieta regular + dieta palatável (rica em gordura e açúcar)

b) Intervenção com dieta regular + dieta palatável (rica em gordura e açúcar).

Os grupos receberam rações novas às quais não estavam acostumados durante 7 semanas, portanto mesmo a ração regular era diferente da ração padrão consumida pelos animais até então. A composição da ração regular era: 22% proteína, 4% de gordura, 60% carboidrato, 3,64Kcal/g; a dieta palatável consistia em 14% de proteína, 34% de gordura, 30,2% de carboidrato (sendo 20% em sacarose); 4,82Kcal/g. Ambas as dietas foram produzidas pelo laboratório Prag Soluções Biociências® (São Paulo, Brasil), visando minimizar possíveis vieses. O consumo foi avaliado semanalmente.

5.1.6 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é especifico 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 inicio 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 initerruptamente 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 numero 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, 2006; PIRES *et al.,* 2012).

5.1.7 Estresse por contenção de movimento

O estresse por contenção de movido foi realizado por colocação do animal em um tubo plástico incapacitando-o de se mover por 20 min. Um orifício frontal foi deixado permittindo 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 á imobilização do animal, T20', 40', 60' e 90'. Ao final do teste o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 5000RCF a 4ºC. O sobrenadante correspondente ao soro foi distribuído em microtubos, e levado ao freezer -80ºC, onde permaneceram até o dia das análises de corticosterona (ELY *et al.*, 1997).

5.1.8 Coleta de material biológico

Os animais foram decaptados após jejum de 4h com aproximadamente 120 dias. O sangue do tronco foi coletado em tubos e as amostras, centrifugadas e o plasma separado e armazenado a -80ºC. As duas maiores porções de gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas por 2 pesquisadores treinados e pesadas, usando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Os resultados da quantidade de gordura abdominal foram calculados como percentual do peso corporal.

5.1.9 Análise Bioquímicas

A corticosterona foi avaliada por ELISA, usando os kits comerciais Corticosterone EIA Kit Enzo Life Sciences Int'l Inc., Plymouth Meeting, PA, USA, seguindo as instruções dos fabricantes. As determinações de corticosterona foram realizadas na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

5.2 ANÁLISES ESTATISTICAS

Todos os dados coletados foram digitados e analisados no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). ANOVA de uma via foi utilizada para o cuidado materno e a análise do percentual de gordura abdominal (ambos usando como fator o grupo neonatal ajustando para o tamanho da ninhada) e também para o peso das adrenais utilizando o peso corporal como co-variável. A ANOVA de medidas repetidas, (peso corporal antes e depois das dietas, consumo de dieta regular e padrão) foram utilizadas utilizando como co-variável o tamanho da ninhada usando grupo neonatal como fator e ajustado pelo tamanho da ninhada quando necessário (isto é, quando essas co-variáveis afetavam significativamente o desfecho nos resultados de análises preliminares). Utilizou-se o Teste t de Student para avaliação para avaliação comportamental no teste labirinto em cruz elevado. A análise por Equações de Estimação Generalizadas (GEE) foi usada para a resposta hormonal ao estresse agudo (corticosterona). Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

5.3 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 (2011) e de acordo com as considerações estabelecidas pela Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e pela Lei Arouca (Lei no 11.794 de 8 de outubro de 2008).

Os pesquisadores fizeram uso de jaleco, luvas, toucas e pró-pés durante a permanência na Unidade de Experimentação Animal, onde o projeto foi desenvolvido.

5.4 DESCARTE DE RESIDUOS

O manuseio e o descarte de solventes e reagentes foram realizados conforme as rotinas do Hospital de Clínicas. O descarte dos animais também seguiu a rotina do HCPA: após a morte dos animais por decapitação, as carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos de cor branca, próprios para descarte, e armazenadas em freezer a – 18ºC. Em seguida o material foi descartado de acordo com o procedimento padrão da UEA.

6 RESULTADOS

6.1 GRUPO CONTROLE E INTERVENÇÃO

6.1.1 Cuidado materno

As genitoras do grupo intervenção apresentaram uma menor média de LG comparadas as controles [F (1, 11)=7,421, p=0,020], ficaram maior tempo em contato com a prole [F (1, 11)=8,902, p=0,012] e apresentaram comportamento de deixar os filhotes agrupados [F (1, 11)=11,150, p=0,007]. Porém, passaram menos tempo amamentando [F (1, 11)=11,490, p=0,006] e ficaram maior tempo na posição 1 e 2 [F (1, 11)=4,840, p=0,050], consideradas posturas menos eficazes, porém, não houve diferença estatísticamente significativa entre as posições 3 e 4 [F (1, 11)=1,480, p=0,249] e a posição passiva [F (1, 11)=4,093, p=0,068], (tabela 1) .

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

Variáveis	Controle (n=7)	Intervenção (n=7)	Valor *p*
LG	20,113±1,31	15,264±4,26	0,020*
Amamentação Total	49,23±15,24	35,50±8,84	0,006*
Posição de amamentação 1	8,78±2,02	13,52±4,00	0,022*
Posição de amamentação 1 e 2	25,60±4,27	32,99±7,28	0,050*
Posição de amamentação 3 e 4	10,92±1,86	9,29±3,42	0,249
Posição de amamentação passiva	4,33±2,27	2,48±1,58	0,068
Contato Puro	5,19±0,87	7,20±1,74	0,012*
Filhotes separados	17,16±12,28	4,26±5,83	0,007*

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

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

A ANOVA de medidas repetidas, considerando 6 semanas após o desmame (antes do inicio da dieta), utilizando como co-variável o tamanho da ninhada, demonstrou que houve efeito do isolado do tempo [F (5, 75)=52,137 p<0,0001], mostrando que 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]. 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 8.

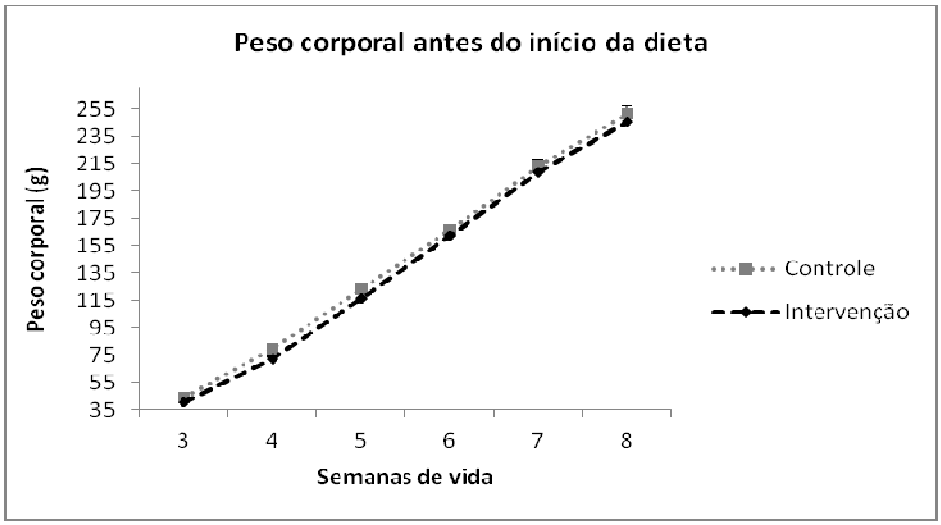

Figura 7 - Peso corporal, ao longo de 6 semanas, após o desmame, nos machos (n=8), machos intervenção (n=10). Dados expressos em média ± EP . ANOVA de medidas repetidas não mostrou interação entre tempo e grupo neonatal (p=0,945), somente efeito isolado do tempo.

6.1.3 Peso Corporal ao longo de 7 semanas de dieta

A ANOVA de medidas repetidas, ao longo de sete semanas com as novas dietas, demostrou 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 9).

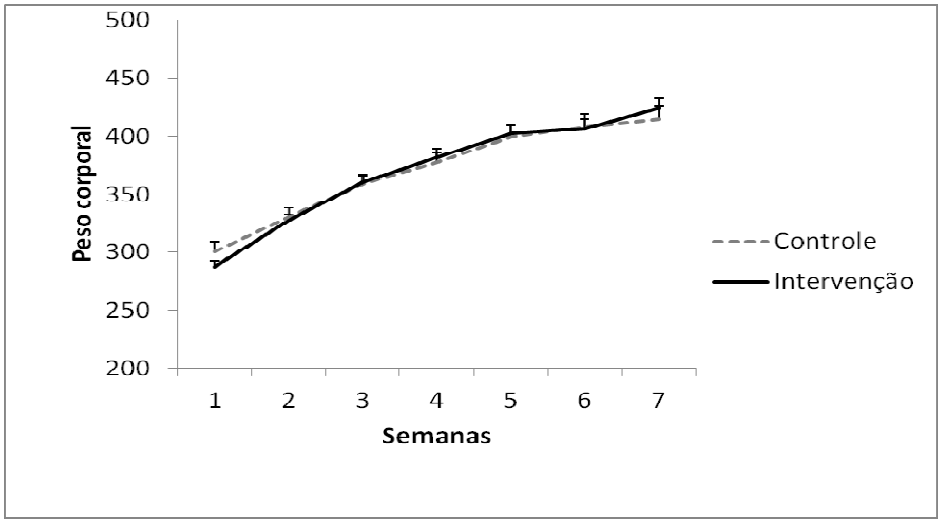

Figura 8 - Peso corporal, usando tamanho da ninhada como co-variável, ao longo de 7 semanas de dieta nos machos controle (n=8), e intervenção (n=10). Dados expressos em média ± EP. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou e efeito isolado do tempo (p<0,0001).

6.1.4 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, consequentemente 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 2.

Tabela 2 - 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; * diferenças estatísticas (p< 0.005). RetroP: retroperitoneal; Abd. Total: abdominal total.

6.1.5 Teste labirinto em cruz elevado

O Teste t de Student não mostrou interação entre os grupos nas variáveis tempo de permanência nos braços abertos [F(15, 26) =0,344, p=0,333], frequência de entrada nos braços abertos [F(15, 1,42) =0,952, p=0, 287], e tempo de permanência nos braços fechados [F(15, 21,94) =0,2043, p=0,377]. Contudo observou se uma tendência de maior frequência de entrada nos braços fechados no grupo intervenção [F(15, 1,0) =4,116, p=0,056]. Não houve diferença signitificativas no comportamento do tipo ansioso entre os grupos intervenção e controle (tabela 3).

Tabela 3 - Variáveis analisadas no teste do labirinto em cruz elevado, conforme o grupo neonatal.

Variável	Controle (n=9)	Intervenção (n=19)	Valor do p
tempBA	45,51±49,06	71,87±58,49	0,333
tempBF	189,1±42,45	169,1±47,40	0,377
freqBA	2,74±2,37	4,33±3,35	0,284
freqBF	7,25±1,16	9,44±2,78	0,056
freqM	12,5±6,96	16,67±8,26	0,282

Teste T; valores expressos em média ± DP, * diferença estatística significativa (p<0,05).tempBA: tempo de permanência no braço aberto (s); tempBF: tempo de permanência no braço fechado (s); freqBA: número de entradas no braço aberto; freqBF: número de entradas no braço fechado; freqM: freqüência do comportamento de mergulhar

6.1.6 Consumo de ração padrão ao longo das 7 semanas

ANOVA de medidas repetidas, considerando sete semanas de acompanhamento do consumo de ração padrão, demonstrou que houve efeito isolado do tempo [F(6, 132) =6132, p<0,0001]. Não houve interação entre o tempo e o grupo neonatal [(F6, 132) =0,844, p=0,539]. Mostrando que não houve diferenças significativas entre os grupos controle e intervenção no consumo de ração padrão (Figura 10).

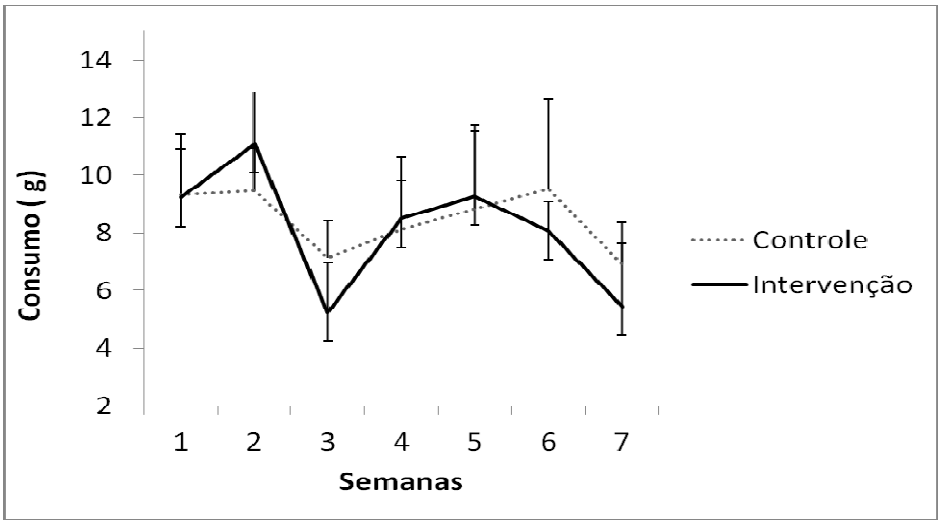

Figura 9 - Consumo de ração padrão ao longo de 7 semanas. ANOVA de medidas repetidas demonstrou que não houve interação entre tempo e grupo neonatal (p=0,539) somente efeito isolado do tempo p<0,0001.Grupos controle (n= 3 caixas) intervenção (n=3 caixas). Valores expressos em média ± EP.

6.1.7 Consumo de palatável ao longo das 7 semanas.

ANOVA de medidas repetidas, considerando sete semanas de acompanhamento do consumo de ração palatável, demonstrou que houve efeito do tempo [F(6, 24) =2,996, p=0,02], e nem interação entre o tempo e o grupo neonatal [(F6, 24) =1,038, p=0,426]. Mostrando que não houve diferenças significativas entre os grupos controle e intervenção no consumo de ração palatável. (Figura11)

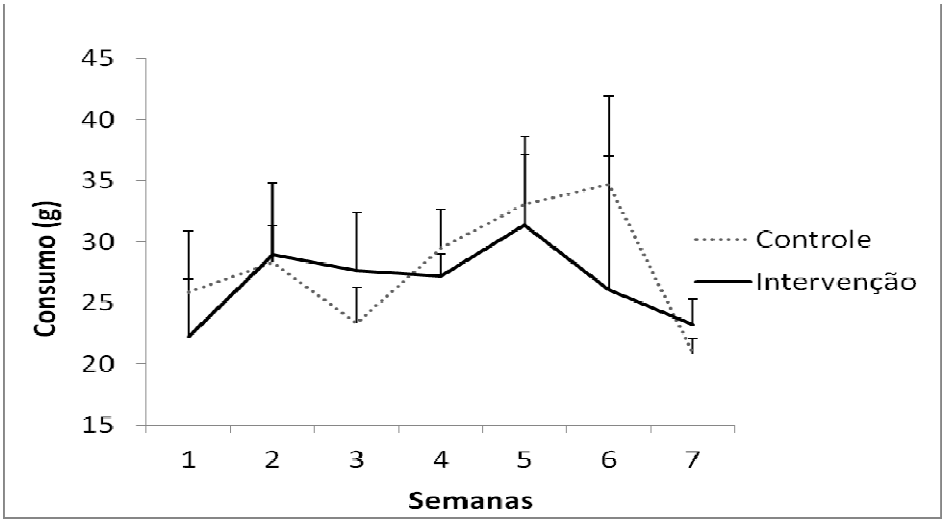

Figura 10 - Consumo dieta palatável ao longo de 7 semanas. ANOVA de medidas repetidas demostrou efeito isolado do tempo p=0,025 sem interação entre grupo neonatal e tempo p=0,426. Grupos controle (n=3 caixas) e intervenção (n= 3 caixas). Valores expressos em média ± EP.

6.1.8 Peso das adrenais.

ANOVA de uma via usando o peso corporal como co-variável não demostrou não houve diferenças estatísticas no peso medio das adrenas entre os grupos intervenção e controle. [(F15, 0,007) = 3,385, p=0,86] (Figura 12).

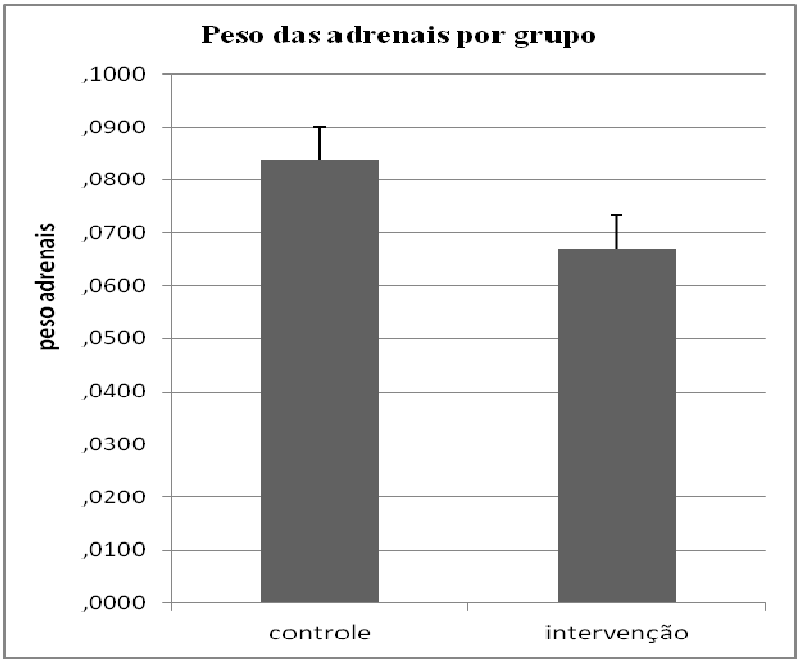

Figura 11 – Peso das adrenais. ANOVA de uma via usando o peso corporal como co-variável; valores expressos em média ± EP; não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, p=0,086.

6.1.9 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por cotenção de movimento.

Em análise da curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimentos usando Equações de Estimação Generalizadas (GEE) os resultados mostraram que não houve interação entre o grupo neonatal e o tempo nos níveis periféricos de corticosterona em resposta ao estresse [GEE, 2, 778: 4, p=0,596. Não houve efeito isolado do grupo neonatal [GEE, 0, 959: 1, p=0,327] nem efeito isolado do tempo [GEE, 13, 534; 4, p=0,009] (figura 13).

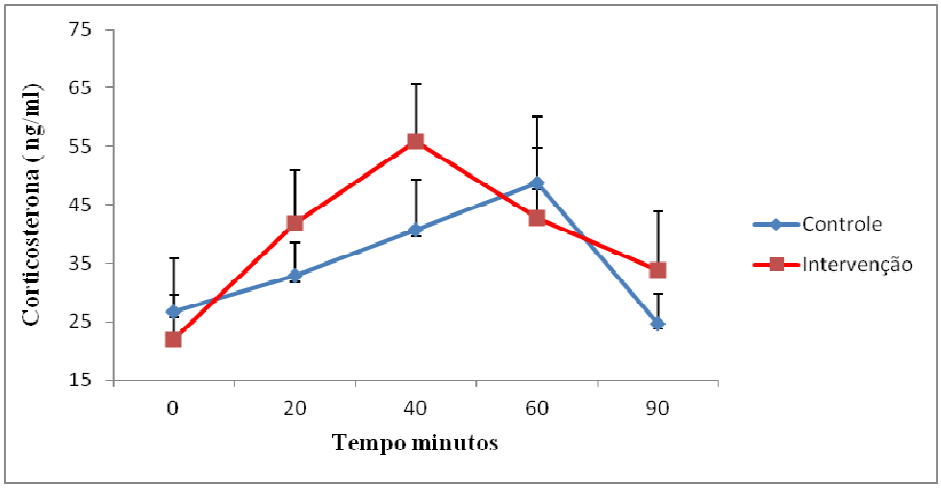

Figura 12 - Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimentos nos machos controles (n= 8) e machos intervenção (n=10). O período de exposição ao estresse por restrição de movimentos conpreende o intervado de tempo (T0´ ao T. 20´). Dados espressos em média ± EP; Teste A análise por Equações de Estimação Generalizadas demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos, p=0, 327.

7 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho consistiram em: (1) menor frequência de LG e (2) maior tempo das genitoras do grupo intervenção em postura de amamentação de menor qualidade, (3) peso corporal equivalente entre os grupos antes das dietas. Após o uso crônico das dietas houve (4) maior acúmulo de gordural abdominal (retroperitoneal e gonadal) no grupo intervenção, contudo, (5) sem diferença no peso corporal ao longo de sete semanas, (6) no consumo de rações, (7) no comportamento do tipo ansioso, (8) no peso das adrenais (9) e nos níveis de corticosterona em resposta ao estresse.

Em relação ao cuidado materno, as genitoras do grupo intervenção passaram mais tempo em contato com a prole, porém com menor comportamento de lambidas (LG-licking and grooming) e maior tempo em posturas de amamentação menos arqueadas (de baixa qualidade), mas sem diferença nas posturas mais arqueadas (maior qualidade). Este resultado corrobora com outros estudos que utilizam o mesmo modelo animal (IVY *et al.*, 2008; DALLE MOLLE *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013). A natureza do roedor de lamber seus filhotes durante os primeiros 10 dias leva ao desenvolvimento das respostas neuroendócrinas ao estresse, resultando em redução plasmática de corticosterona, menores níveis de CRH e de respostas ao estresse agudo (LIU *et al.,* 1997). Nesse período a prole apresenta atividade do eixo HPA diminuída, sendo conhecido na literatura por ser um período caracteristico de hiporresponsividade (LIU *et al.,* 1997; PARFITT *et al.*, 2004). Contudo alterações no cuidado maternal seriam capazes de superar essa fase de hiporresponsividade na prole, aumentando os níveis endógenos de resposta ao estresse (PLOTSKY *et al.*, 2005; RICE *et al.,* 2008; MORICEAUl *et al.,* 2012). Dessa forma, o ato da genitora lamber os filhotes tem sido implicado na redução de respostas ao estresse nos filhotes (PARFITT *et al.,* 2004; IVY *et al.,* 2008; BARAM *et al.,* 2013). Contudo, no modelo utilizado neste trabalho a mãe está presente, porém, o cuidado oferecido a prole é diferente do que seria considerado “normal”. O comportamento maternal apresenta naturalmente variabilidade, que é expressa especialmente através do ato de lamber os filhotes (LG) regulando o desenvolvimento endócrino, emocional e de resposta ao estresse (CHAMPAGNE et al., 2003). Filhos de mãe altamente cuidadoras apresentam menores níveis de corticosterona em situações de estresse quando, comparadas a filhotes de mães menos cuidadosas (menor LG) (LIU *et al.,* 1997). As mães altamente cuidadoras beneficiam seu filhote, realizando lambidas com maior frequência e isso leva a alterações epigenéticas que culminam com maior esxpressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo (MEANEY *et al.,* 2000; WEAVER *et al.*, 2004). É demonstrado na literatura,

através deste mesmo modelo neonatal de trauma, que as mães 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 a estresse materno e diminuição da habilidade de exercer um comportamento materno padrão (IVY *et al.*, 2008). Seguindo esse mesmo protocolo é visto 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 dos grupos intervenção comparado aos controles. Esses resultados também foram encontrados em animais na vida adulta. (AVISHAI-ELINER *et al.,* 2001; RICE *et al.,* 2008).

Com relação ao comportamento do tipo ansioso, no presente trabalho não foram encontradas diferenças neste tipo de comportamento entre os grupos após o consumo crônico de dieta palatável. Estudos demonstram que a exposição à dieta palatável reduz a ansiedade no labirinto em cruz elevado (PRASAD; PRASAD, 1996). Anteriormente, em estudo com modelo neonatal de trauma precoce, foi visto que tanto machos quanto fêmeas apresentam esse comportamento em diferentes testes comportamentais (DALLE MOLLE *et al.,* 2012; MACHADO *et al.,* 2013). Porém, no presente trabalho, a diferença que existia passa a não existir mais.

A exposição precoce ao estresse e os cuidados maternos de baixa qualidade estão associados ao desenvolvimento de comportamento do tipo ansioso, em humanos e roedores (DALLE MOLLE *et al.*, 2012; BARAM *et al.*, 2013; CHOCYK *et al*., 2013; MASÍS-CALVO *et al.,* 2013). Utilizando o modelo animal de restrição de material para confecção do ninho, estudos encontraram um comportamento ansiogênico em machos e fêmeas adultos do grupo intervenção no teste labirinto em cruz elevado, cujo animal ansioso tem comportamento menos exploratório e passar mais tempo nos braços fechados (DALLE MOLLE *et al.,* 2012). Observação semelhante foi vista no teste de supressão alimentar em fêmeas adultas do grupo intervenção, que apresentam um tempo de latência maior para o consumo de alimento doce, em um ambiente novo, mesmo em presença de fome, evidenciando um comportamento relacionado à ansiedade (MACHADO *et al.,* 2013).

Com relação ao peso corporal no presente trabalho, antes do uso crônico das dietas, não houve diferença estatísticamente significativa. DALLE MOLLE e colaboradores em 2012 ao utilizar esse modelo neonatal, não encontraram diferença no peso corporal dos animais de

ambos sexos, ao longo de 8 semanas de acompanhamento. Porém, outro estudo utilizando somente fêmeas verificou, que as do grupo intervenção ao longo de 13 semanas, apresentam menor peso corporal, comparadas as controles (MACHADO *et al.*, 2013).

Após a opção de uso crônico do alimento palatável ao longo de 7 semanas não houve diferença de peso entre os grupos. Em fêmeas, ao longo de quatro semanas de exposição às dietas regular e palatável, também não foi encontrada essa diferença no peso entre os grupos (MACHADO *et al.*, 2013) nem o acúmulo de gordura abdominal. Porém no presente estudo, apesar de não ter diferença de peso e no consumo entre os grupos após a opção de uso da dieta palatável, houve acúmulo de gordura abdominal (retroperitoneal e gonadal) nos machos do grupo intervenção. Usando esse mesmo modelo neonatal foi demonstrado, um menor peso corporal e aumento das adrenais, nos filhotes que passaram pela intervenção neonatal (BRUNSON *et al.,* 2005).

Altos níveis de cortisol, no estresse crônico, promovem mudanças metabólicas, levando a mobilização de aminoácidos e ácidos graxos periféricos para serem usados na síntese de glicose pelo fígado. No entanto, estudos não encontram aumento no consumo de dieta palatável (DALLMAN *et al.,* 2003), bem como, ocorre no presente estudo. Isso sugere que os efeitos dos glicocorticoides promovem uma redistribuição da energia armazenada, aumentando a adiposidade abdominal e diminuindo a massa magra.

Na resposta ao estresse os glicocorticoides agem nos receptores do hipotálamo, hipocampo e hipófise reduzindo a atividade do eixo HPA e diminuindo os níveis de glicocorticoides circulantes. No estresse crônico alterações no eixo HPA modificam a resposta ao estresse, alterando a sensibilidade central aos glicocorticoides (DALLMAN *et al.,* 2005; MORRIS *et al.,* 2014). Em animais cronicamente estressados quando submetidos a estresse agudo respondem com maiores níveis de corticosterona (DALLMAN *et al*., 2005; PECORARO *et al.,* 2006). É proposto que os glicocorticoides atuariam favorecendo o consumo de alimentos palatáveis, promovendo o aumento da adiposidade visceral que serviria como um sinal secundário a retroalimentação negativa do eixo HPA; diminuindo o estresse percebido pelo o organismo (ADAM; EPEL, 2007). Por mecanismos ainda não elucidados sugere-se que o consumo de dieta palatável em períodos de estresse causa uma sensação de bem estar, com redução de respostas neuroendócrinas e comportamentais ao estresse.

Adicionalmente, estudos indicam que os glicocorticoides 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). A secreção de insulina e leptina atuam como um sinal de adiposidade (SILVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, o aumento no tecido adiposo, e a ação dos glicocorticoides sobre o metabolismo leva à resistência a insulina. Com a hiperinsulinemia há um aumento dos níveis de leptina no plasma, cuja hipersecreção está associada à sensibilidade diminuída a leptina. Também foi visto em roedores, uma redução da sensibilidade a leptina dose dependente à administração de glicocorticoides (FRIED *et al.,* 2000; PECORARO *et al.,* 2006). Desse modo, adiposidade visceral associada a resistência a leptina, a longo prazo, poderia levar os animais do grupo intervenção a aumentarem de peso, por consequência da hiperfagia ((FRIED *et al*., 2000; MORTON *et al.,* 2014).

Danese e colaboradores (2014) abordam a relação entre estresse e redução na resposta a leptina. Seus resultados mostram que crianças expostas a maus tratos apresentaram menores níveis de leptina em relação ao tecido adiposo corporal, indicando uma deficiência deste hormônio. Desse modo, uma redução nas sinalizações dos glicocorticoides a nível central, poderia levar a redução dos estímulos dos glicocorticoides sobre a secreção de lepitina, aumentando a hiperfagia (DANESE *et al.,* 2014). Em roedores, a manipulação no período neonatal resultou em diminuição da saciedade, quando comparadas ao controle; levando ao consumo de maior quantidade de alimentos palatáveis para atingir a saciedade (SILVEIRA *et al.,* 2010).

A literatura demonstra que animais que passaram pela situação de separação materna ingerem mais alimentos doces, comparado ao seu controle; na vida adulta estes animais comem mais, mesmo sem fome (SILVEIRA *et al.,* 2004). Em humanos, mulheres que respondem com maiores níveis de cortisol quando submetidas ao estresse, aumentaram o consumo de alimentos confortantes (EPEL *et al.*, 2001). Estudos utilizando ratos adrenalectomizados encontrou um aumento na ingestão de alimentos palatáveis proporcionalmente as concentrações circulantes de glicocorticoides (DALLMAN, 2010). Desse modo, tem sido sugerido que o consumo de alimentos palatáveis reduz os níveis de glicocorticoides diminuindo as respostas ao estresse, que por sua vez aumenta a preferência por estes alimentos como uma medida de conforto (MORRIS *et al*., 2014). Em roedores o estresse no inicio da vida parece aumentar a preferencia por "*comfort foods*" na vida adulta. Redução nos níveis de corticosterona e ACTH, também foram encontrados em diferentes situações de estresse após o consumo de dieta palatável (ELY *et al*., 1997; BUWALDA *et al.,*

2001; PECORARO *et al.,* 2004). Da mesma forma, efeitos semelhantes foram observados em humanos (TOMIYAMA *et al.,* 2011). Além disso, a exposição à dieta palatável também reduziu a ansiedade no labirinto em cruz elevado (PRASAD; PRASAD, 1996).

Os resultados encontrados neste experimento mostraram que os animais do grupo intervenção apresentaram uma resposta ao estresse agudo (por contenção) com níveis de corticosterona semelhante aos animais do grupo controle na vida adulta. Embora não tenhamos encontrado um aumento no consumo de dieta palatável como medida de conforto na tentativa de reduzir as respostas ao estresse, conforme sugerido por outros trabalhos (DALLMAN *et al.,* 2003; PECORARO *et al.,* 2004, 2006). Sugestivamente parece que o consumo crônico de dieta palatável na vida adulta foi compatível com a redução dos níveis de glicocorticoides para níveis similares aos controles, como foi encontrado por outros estudos (PECORARO et al., 2004). Maiores níveis de corticosterona numa situação de estresse assim como o comportamento do tipo ansioso são demonstrados em fêmeas (MACHADO *et al.,* 2013) e machos que passaram por esse modelo neonatal de trauma neonatal. Curiosamente, os machos apresentam uma resposta diferenciada, levando mais tempo para atingir o pico de corticosterona e respondendo com maiores níveis, ao longo do estresse por conteção de movimentos (DALLE MOLLE *et al.,* 2012). Reforçando que intervenções no ambiente neonatal seriam capazes de produzir uma resposta ao estresse exarcebada, promovendo maior liberação de hormônios de estresse alterando de forma persistente o eixo HPA (PLOTSKY *et al.,* 2005).

8 CONCLUSÃO

Este trabalho apoia-se firmimente nos conceitos de que a alteração no ambiente neonatal, através da limitação do material para confecção do ninho, altera o cuidado maternal durante a vida neonatal produzindo um ambiente adverso. Portanto, esse modelo de trauma neonatal foi eficiente e demonstrou ser consistente, pois reproduziu achados de modelos já existentes.

Após o consumo crônico de dieta palatável, que não diferiu entre os grupos, não houve diferença nos níveis de corticosterona assim como comportamento do tipo ansioso. Contudo interessantemente vimos maior acúmulo de gordura abdominal, sem diferença de peso entre os grupos. Sugerindo que o trauma vivenciado na vida precoce foi capaz de alterar o metabolismo desses animais tornando-os mais sensíveis. Assim, ao ter contato cronicamente com dieta do tipo "*comfort food*" acumulam facilmente gordura abdominal (retroperitoneal e gonadal) e possivelmente em longo prazo esses animais se tornem susceptíveis ao aparecimento de outras alterações metabólicas e consequentemente a obesidade.

9 REFERENCIAS

ADAM, T. C.; EPEL, E. S. Stress, eating and the reward system. **Physiology and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 449–458, 2007.

ALVAREZ, J.; PAVAO, J.; BAUMRIND, N.; KIMERLING, R. The Relationship Between Child Abuse and Adult Obesity Among California Women. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 33, n. 1, p. 28–33, 2007.

AVISHAI-ELINER, S.; GILLES, E. E.; EGHBAL-AHMADI, M.; BAR-EL, Y.; BARAM, T. Z. Altered regulation of gene and protein expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis components in an immature rat model of chronic stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 13, n. 9, p. 799–807, 2001.

BARAM, T. Z.; SOLODKIN, A.; DAVIS, E. P.; et al. Fragmentation and Unpredictability of Early-Life Experience in Mental Disorders. , v. 169, n. 9, p. 907–915, 2013.

BARR, C. S.; NEWMAN, T. K.; SCHWANDT, M.; et al. Sexual dichotomy of an interaction between early adversity and the serotonin transporter gene promoter variant in rhesus macaques. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 33, p. 12358–12363, 2004.

BENETTI, C. D. S.; SILVEIRA, P. P.; WYSE, A. T. S.; et al. Neonatal environmental intervention alters the vulnerability to the metabolic effects of chronic palatable diet exposure in adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 127–37, 2014.. .

BRUNSON, K. L.; LIN, B.; CHEN, Y.; et al. Mechanisms of Late-Onset Cognitive Decline after Early-Life Stress. , v. 25, n. 41, p. 9328–9338, 2005.

BUWALDA, B.; BLOM, W. A M.; KOOLHAAS, J. M.; DIJK, G. VAN. Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 371–377, 2001.

CABALLERO, B. The Global Epidemic of Obesity: An Overview. **Epideniol Rev**, v. 29, n. May 13, p. 1–5, 2007.

CANNON, B. Y. W. B. The emergency function adrenal medulla in pain and the major emotions. **American Journal of Physiloigy**, v. 33, p. 356–372, 1913.

CHAMPAGNE, F. A.; FRANCIS, D. D.; MAR, A.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology and Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359–371, 2003.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. E NDOCRINOLOGY OF THE S TRESS R ESPONSE 1. , 2005.

CHOCYK, A.; MAJCHER-MAOELANKA, I.; DUDYS, D.; PRZYBOROWSKA, A.; WÊDZONY, K. Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions-a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1462–1470, 2013.

COLMAN, J. B.; LAUREANO, D. P.; REIS, T. M.; et al. Variations in the neonatal environment modulate adult behavioral and brain responses to palatable food withdrawal in adult female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 40, p. 70–75, 2015.

D'ARGENIO, A.; MAZZI, C.; PECCHIOLI, L.; et al. Early trauma and adult obesity: Is psychological dysfunction the mediating mechanism? **Physiology and Behavior**, v. 98, n. 5, p. 543–546, 2009.

DALLE MOLLE, R.; PORTELLA, A K.; GOLDANI, M. Z.; et al. Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. **Translational psychiatry**, v. 2, n. 11, p. e195, 2012.

DALLMAN, M. F. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 159–165, 2010.

DALLMAN, M. F.; PECORARO, N.; AKANA, S. F.; et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11696–11701, 2003.

DALLMAN, M. F.; PECORARO, N. C.; FLEUR, S. E. LA. Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 4, p. 275–280, 2005.

DANESE, A.; DOVE, R.; BELSKY, D.; et al. Leptin deficiency in maltreated children. **Translational psychiatry**, v. 4, n. 0, p. 1–5, 2014.

DARNAUDÉRY, M.; MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 571–585, 2008.

ELY, D. R.; DAPPER, V.; MARASCA, J.; et al. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. **Physiology & behavior**, v. 61, n. 3, p. 395–398, 1997.

EPEL, E.; LAPIDUS, R.; MCEWEN, B.; BROWNELL, K. Stress may add bite to appetite in women: A laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 37–49, 2001.

FARRELL, M. R.; SENGELAUB, D. R.; WELLMAN, C. L. Sex differences and chronic stress effects on the neural circuitry underlying fear conditioning and extinction. **Physiology and Behavior**, v. 122, p. 208–215, 2013.

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

GARIEPY, G.; NITKA, D.; SCHMITZ, N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. **International journal of obesity (2005)**, v. 34, n. 3, p. 407–419, 2010.

GENNÉ-BACON, E. A. Thinking evolutionarily about obesity. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 87, n. 2, p. 99–112, 2014.

GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242–256, 2007.

HABIB KALMAL E., GOLD PHILIP W., C. G. P. Neuroendocrinology of stress. **Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 22098, 2001.

IVY, A. S.; BRUNSON, K. L.; SANDMAN, C.; BARAM, T. Z. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. **Neuroscience**, v. 154, n. 3, p. 1132–1142, 2008.

JAHNG, J. W. An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 2, p. 213–220, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.11.010>. .

JHONSON, E. O.; KAMILARIS, T. C.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Mechanisms of stress a dynamic overview of hormonal_Johnson.pdf. , v. 16, p. 115–130, 1990.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. O eixo hipot??lamo-pituit??ria-adrenal, a fun????o dos receptores de glicocortic??ides e sua import??ncia na depress??o. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 189–201, 2004.

KNECHT, S.; ELLGER, T.; LEVINE, J. A. Obesity in neurobiology. **Progress in Neurobiology**, v. 84, n. 1, p. 85–103, 2008.

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5332, p. 1659–1662, 1997.

LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A.; SWANN, J. M.; STERN, J. M. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. **Neuroscience**, v. 82, n. 1, p. 267–281, 1998.

MACHADO, T. D.; DALLE MOLLE, R.; LAUREANO, D. P.; et al. Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for “comfort foods” in adult female rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 16, n. 5, p. 549–56, 2013.

MAKINO, S.; HASHIMOTO, K.; GOLD, P. W. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 147–158, 2002.

MASÍS-CALVO, M.; SEQUEIRA-CORDERO, A.; MORA-GALLEGOS, A.; FORNAGUERA-TRÍAS, J. Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. **Physiology & behavior**, v. 118, p. 212–7, 2013. MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1-2, p. 172–189, 2000.

MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. Neurobiology of Stress Recognizing resilience : Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 1–11, 2015.

MCGOWAN, P.; SASAKI, A.; D'ALESSIO, A.; et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 342–348, 2009.

MCLAUGHLIN, K. A; KUBZANSKY, L. D.; DUNN, E. C.; VAILLANT, G.; KOENEN, K. C. and Mood and Anxiety Disorders across the Life Course. , v. 27, n. 12, p. 1087–1094, 2011.

MEANEY, M. J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; et al. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 3926–3935, 2000.

MOLET, J.; MARAS, P. M.; AVISHAI-ELINER, S.; BARAM, T. Z. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. **Developmental Psychobiology**, 2014.

MORATO, S. O Papel Da Visão Na Aversão Aos Espaços Abertos No Labirinto Em Cruz Elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. L, p. 159–174, 2006.

MORICEAUL, S.; SHIONOYA, K.; JAKUBS, K.; SULLIVAN, R. Early life stress disrupts attachment learning: The role of amygdala corticosterone, locus coeruleus CRH and olfactory bulb NE. **J. Neurosci**, v. 29, n. 50, p. 15745–15755, 2012.

MORRIS, M. J.; BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; REICHELT, A. C.; WESTBROOK, R. F. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2014.

MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 367–78, 2014. Nature Publishing Group.

MOTTA, M. D. G.; LUCION, A. B.; MANFRO, G. G. Efeitos da depressão materna no desenvolvimento neurobiológico e psicológico da criança. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 27, n. 2, p. 165–176, 2005.

MURRAY, S.; TULLOCH, A.; GOLD, M. S.; AVENA, N. M. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 1296, p. 1–51, 2014. Nature Publishing Group.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 2002.

NOLTE, T.; GUINEY, J.; FONAGY, P.; MAYES, L.; LUYTEN, P. Interpersonal stress regulation and the development of anxiety disorders: an attachment-based developmental framework. , v. 5, n. September, p. 1–21, 2011.

PARFITT, D. B.; LEVIN, J. K.; SALTSTEIN, K. P.; et al. Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. **Brain Research**, v. 1016, n. 1, p. 111–118, 2004.

PECORARO, N.; DALLMAN, M. F.; WARNE, J. P.; et al. From Malthus to motive: How the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 5-6, p. 247–340, 2006.

PECORARO, N.; REYES, F.; GOMEZ, F.; BHARGAVA, A.; DALLMAN, M. F. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: Feedforward and feedback effects of chronic stress. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3754–3762, 2004.

PIRES, G. N.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Relação entre privação de sono e ansiedade na pesquisa básica Relationship between sleep deprivation and anxiety – experimental research perspective. , v. 10, n. 11, p. 519–523, 2012.

PLOTSKY, P. M.; THRIVIKRAMAN, K. V; NEMEROFF, C. B.; et al. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 12, p. 2192–2204, 2005.

PRASAD, A.; PRASAD, C. Short-term consumption of a diet rich in fat decreases anxiety response in adult male rats. **Physiology and Behavior**, v. 60, n. 3, p. 1039–1042, 1996.

PRATLEY, R. E.; REN, K.; MILNER, M. R.; SELL, S. M. Insulin increases leptin mRNA expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in humans. **Molecular genetics and metabolism**, v. 70, n. 1, p. 19–26, 2000.

PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 38, n. 4, p. 239–251, 2001.

RICE, C. J.; SANDMAN, C. A.; LENJAVI, M. R.; BARAM, T. Z. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 4892–4900, 2008.

SELYE, H. A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. **Neuropsychiatry Classics**, v. 10, n. 2, p. 230–231, 1998.

SHIKANAI, H.; KIMURA, S.; TOGASHI, H. Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1392–5, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995647>. .

SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; ASSIS, S. A C. N.; et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 111–118, 2010.

SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; CLEMENTE, Z.; et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 5, p. 739–745, 2004.

SILVEIRA, P. P.; SILVA BENETTI, C. DA; AYRES, C.; et al. Satiety assessment in neonatally handled rats. **Behavioural Brain Research**, v. 173, n. 2, p. 205–210, 2006.

STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 231–249, 2002.

STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 495–506, 2011.

TOMIYAMA, A. J.; DALLMAN, M. F.; EPEL, E. S. Comfort food is conforting to those most stressed: Evidence of the chronic stress response network in high stress women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36(10), p. 1513–1519, 2011.

TURECKI, G.; MEANEY, M. J. Review Effects of the Social Environment and Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Methylation : A Systematic Review. , p. 1–10, 2014.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural Regulation of endocrine and Autonomic Stress Responses. **Nat Rev. Neurosci**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

VARGHESE, S.; MONTALVO-ORTIZ, J.; CSERNANSKY, J.; et al. Early life stress as a risk factor for substance use disorders: Clinical and neurobiological substrates. **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 37, n. 1, p. 36, 2015.

WEAVER, I. C. G.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A; et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–854, 2004.