

MATILDE CESIANA DA SILVA

**ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA: ESTUDO DO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS**

Recife, 2012

MATILDE CESIANA DA SILVA

**ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA: ESTUDO DO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Nutrição

Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Lopes de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Bolaños-Jimenez

Recife, 2012

Catálogo na publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586e Silva, Matilde Cesiana da.
Estresse por separação materna: estudo do comportamento alimentar em ratos / Matilde Cesiana da Silva. – Recife: O autor, 2012.
107 folhas : il. ; graf. ; 30 cm.

Orientador: Sandra Lopes de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Estresse. 2. Separação materna. 3. Comportamento alimentar. 4. Dieta. I. Souza, Sandra Lopes de. (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-216)

MATILDE CESIANA DA SILVA

**ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA: ESTUDO DO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS**

Tese aprovada em 08 de março de 2012

Sandra Lopes de Souza, UFPE

Elizabeth do Nascimento, UFPE

Lisiane dos Santos Oliveira, CAV-UFPE

Débora Catarine Nepomuceno Pessoa, UFPE

Carolina Peixoto Magalhães, CAV-UFPE

Recife, 2012

A DEUS,

À MINHA AVÒ JOSEFA

Á MINHA MÃE MARGARIDA

Á MINHA TIA RAIMUNDA

AO MEU IRMÃO ERALDO

Á MINHA ESTAGIÁRIA JULLIET

Á MINHA ORIENTADORA SANDRA LOPES.

Sem mandamentos

Hoje eu quero a rua cheia de sorrisos francos

De rostos serenos de palavras soltas

Eu quero a rua toda parecendo louca

Com gente gritando e se abraçando ao sol

Hoje eu quero ver a bola da criança livre

Quero ver os sonhos todos na janela

Quero ver vocês andando por ai

Hoje eu quero que os poetas dancem pela rua

Pra escrever a música sem pretensão

Eu quero que as buzinas toquem flauta doce

E que triunfe a força da imaginação

Oswaldo Montenegro

Dedicatória

A DEUS por tudo que me permitiu viver, e por estar comigo em todos os momentos na realização deste trabalho.

À Nossa Senhora, a quem recorro por intercessão ao seu filho Jesus.

À minha vizinha Josefa, o meu amor incondicional, não existe palavras no dicionário que traduzam a imensidão do meu amor por ti, és a razão de todas as minhas conquistas, TE AMO ao infinito!

À minha mãezinha Margarida, a flor mais linda da minha vida, uma guerreira, um ser humano admirável. Mesmo em uma condição adversa sempre me mostrou o caminho do bem. Sou tua fã e grande admiradora. Obrigada por tudo! TE AMO!.

À minha tia Raimunda. Teus conceitos de vida foram fundamentais para a minha formação como pessoa. Obrigada por ter me apresentado a UFPE pela primeira vez. O nosso sonho está se concretizando. TE AMO!

A Francisco Henrique a criança que deixa os meus dias mais felizes. TE AMO pequenino!

Ao meu irmãozinho lindo Eraldinho que Amo muitooooooooo, e à minha sobrinha Sofia que está vindo para completar a nossa FELICIDADE.

Ao meu Padrasto Eraldo pelo carinho e torcida de sempre. Obrigada por tudo!

À Patricia Lauriana , amiga em todos os momentos. Gosto muito de você!

À minha tia Fátima e à minha cunhada Fernanda. Muito obrigada!

Agradecimentos especiais

À minha orientadora Sandra Lopes de Souza, a qual carinhosamente chamo de chefinha. Um ser humano lindo, a quem me espelho para ser uma profissional melhor pela sua inteligência admirável, competência e simplicidade. Como é prazeroso tê-la como orientadora, amiga e fazer parte do teu laboratório. Obrigada por tudo! Te amo!

Ao Professor Raul Manhães de Castro todo o meu carinho. Pesquisador que pensa sempre no crescimento pessoal e profissional dos seus orientandos. Ao senhor minha eterna gratidão por ter me aceitado como estagiária de iniciação científica. Simplesmente adoro! Obrigada por tudo!

Ao Dr. Francisco Bolaños-Jimenez pela contribuição em todas as etapas deste trabalho, pelos artigos enviados que me proporcionaram grande aprendizado. Pesquisador que tenho grande admiração.

À Débora Catarine Nepomuceno Pessoa, “o Anjo da minha vida”. Levarei comigo todos os teus ensinamentos. Para mim é um privilégio e uma honra ser considerada a tua terceira filha.

Agradecimentos

À minha estagiária Juliet Souza, uma “futura grande pesquisadora”. Obrigada por ter me ajudado em toda parte experimental, por ter fortalecido a minha fé, e me mostrado que DEUS está sempre ao nosso lado. Sem você a trajetória seria mais longa. Tenho grande ADMIRAÇÃO POR VOCÊ!

À Rhowena Jane, amiga, irmã e a responsável por tudo! Se você não tivesse me levado para ser estagiária do laboratório do Professor Raul, talvez a trajetória tivesse sido diferente! Eu não teria conhecido pessoas tão especiais e não teria vivido momentos inesquecíveis na ciência. TE ADOROooooooooooooooooooooo!

À Vaninho amigo de fé, irmão camarada! Geovana também faz parte deste agradecimento!

À Flávia Henrique a tradução de uma verdadeira AMIZADE. Presente de Deus em minha vida, minha eterna mala sem alça.

À família Peixoto: Caluzinha, Pedro, Gabriel e ganhamos mais um agregado Geraldinho. Tenho um carinho enorme por vocês. Carolzinha uma pérola, AMIGA com letras maiúsculas, independente qual seja o problema, ela está sempre disposta a ajudar. Uma das pessoas mais prestativas e humanas que conheço. Claro que não posso deixar de falar na elegância, pois ela é chiquérrimaaaaaaa, Deixou de presente em minha vida uma outra pérola em forma de ranso de pobreeeeeeee, Renata Campina, a tradução da solidariedade, da amizade, da alegria, aprendi com ela que na vida não existem limites para ajudar ao próximo. Aprendi também que nem sempre conseguimos chegar na última página do livro O Pequeno Príncipe e entender que a flor faz parte de sua vida, que o damasco pode ser confundido com jaca e que ao camarão do Léoooooo não se pode deixar de ir (KKKKKKKKKK). Adoroooooooooo todos vocês!

À família Nepomuceno, Sr. Pessoa, Kátia, Lú, Sérgio e Pedrinho, obrigada pelo carinho e amizade. É muito bom saber que posso contar com vocês.

À família Souza, Sandra Lopes, Dona Marluce, Sr. Amaro e Wilson pelo apoio e amizade durante estes 12 anos.

À Lígia Galindo, amiga presente em todas as etapas deste trabalho, sempre disposta a ajudar, buscando sempre soluções para as resoluções dos problemas. Lili valeu por tudo! Adoro você. Sérgio é uma pessoa extremamente prestativa e Giovana, linda também, faz parte deste agradecimento. A vocês muito obrigada!

À Amanda Marcelino, a conselheira nos momentos duvidosos. Por trás daquela forma explosiva de expressar-se, existe uma pessoa extremamente carinhosa e doce que sempre está disposta a ajudar.

À Elizabeth do Nascimento, carinhosamente á chamo de Betina, uma pessoa amiga, prestativa, inteligente. Muito obrigada pelo acompanhamento e pelas contribuições nos seminários durante estes quatro anos. Saudadesssssss de você!

À Lisiane Oliveira, Lisi, tenho um carinho enorme por você! Muito obrigada pela ajuda na conclusão deste trabalho.

À Aline Isabel, Alininha, uma pessoa verdadeira. Quantos momentos felizes vivenciados durante estes quatro anos! Foi muito bom tê-la em minha casa e ter compartilhado bons momentos com vizinha. Não tenho dúvidas que ainda iremos rir muito.

À Manuela Figueiroa. Manulita, tenho um carinho enorme por você, uma pessoa de uma bondade grandiosa. Adoro as nossas rápidas conversas sobre a vida.

À família que forma o grupo do comportamento alimentar Tássia e Manu, as cultas; Isabele, a ansiosa; Larissinha, a nossa eterna estagiária (quero ter uma filha igual á você); Lívia, a calma em pessoa; Mara e Paula, as elegantérrimas e a Tércya que chegou para completar o grupo. Cada uma com suas particularidades faz o nosso convívio prazeroso. Meninas, vocês são especiais!

À Neci. Necisinhaaaa te amooooooooooooooooo!

À Maria do Carmo Medeiros, Francisca Bion e Edigleide pelo apoio, torcida e carinho durante todos estes anos.

Ao Sr. Paulino *in memórian*, o Laboratório de Nutrição Experimental não é mais o mesmo sem o senhor. Muito obrigada por tudo! Ao Sr. França pela atenção e disponibilidade dos animais para a execução da pesquisa.

Às colegas de trabalho Michele Galindo, Marisilda Almeida, Roberta Bento e Silvana Arruda pelo apoio nesta fase de Doutorado.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela disponibilidade da bolsa no primeiro ano de Doutorado, e o financiamento da parte experimental.

Resumo

Entre os fatores que podem modificar a responsividade do organismo ao estresse, estão experiências que incidem durante o período de rápido desenvolvimento do sistema nervoso. A separação periódica entre mães e filhotes tem sido utilizada como modelo de estresse perinatal. Ratos provenientes desse modelo apresentam na vida adulta elevada responsividade ao estresse e ansiedade, déficits de aprendizado e memória e modificações na expressão de comportamentos. O presente estudo teve como objetivo investigar, em ratos machos e fêmeas, os efeitos da separação materna periódica durante a lactação em diferentes ciclos de luminosidade sobre parâmetros do controle do comportamento alimentar na vida adulta. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes do biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. A separação entre mães e filhotes foi realizada do 1º ao 14º dia de vida, por seis horas, nos períodos claro ou escuro do ciclo de luminosidade. Na vida adulta aos 180 dias, foram avaliados a Sequência Comportamental de Saciedade, a preferência a macro-nutrientes, resposta a dieta palatável e ao jejum, bem como dosagem de corticosterona sanguínea. Em relação ao consumo alimentar fêmeas separadas no claro foi maior (CF=8.2±0.2 n=10 v.s SCF= 9.9±0.3 n=10, P<0.05) quando comparado com as fêmeas controle. Quando comparamos os gêneros (machos e fêmeas) observamos que as fêmeas apresentaram maior consumo alimentar (CF=23.3±0.5, n=10 v.s CM= 18.2 ±0.7, n=10, P<0.001). No teste de preferência alimentar, houve aumento no consumo de proteína (CF= 4.1±0.7, n=8 v.s SCF= 7.1±0.5, n=8, P<0,05), redução de lipídios (CF= 17.7±0.9, n=8 v.s SCF= 13±1.1, n=8, P<0,001) e nenhuma alteração de carboidrato (CF= 15.7±0.7, n=8 v.s SCF= 14.2±0.8, n=8, P>0.05) por fêmeas comparado ao seu controle. Fêmeas de separação materna apresentaram maior ingestão de alimentos palatáveis (CF=15.41±0.43 v.s SCF= 17.71±0.69 P<0.001). Para ratos machos, foi identificado aumento nos níveis de corticosterona apenas para aqueles separados durante o período escuro do ciclo (CM=128,4±13,4, n=8 v.s SEM= 173,9±12,8, n=10, P<0,05). Para fêmeas foi observado maior corticosterona devido a separação materna independente do ciclo de luminosidade (CF=74,6±8, n=8 v.s SCF=142,7±12, n=8, P<0,001; CF=50,5±9,3, n=5 v.s SEF=153,5±8,9, n=9, P<0,001). Neste estudo, observamos algumas diferenças em parâmetros do consumo alimentar entre animais separados de suas mães durante o período claro e escuro. Esses resultados indicam que diferentes fatores envolvidos na interação mãe-filho apresentam influências programadoras distintas sobre o padrão do comportamento alimentar na vida adulta.

Palavras -chave: Estresse, separação materna, comportamento e preferência alimentar

Abstract

Among the factors that may modify the responsiveness of the organism to stress, there are insults during the fast period of nervous system development. The periodic separation between mothers and infants has been used as a perinatal stress model. Rats submitted to this stressful model show high responsiveness in adult age to stress and anxiety, deficits in learning and memory, and changes in the behaviors patterns. The present study aimed to investigate in adult rats the effects of periodic maternal separation during lactation in different light cycles on parameters of the feeding behavior control. Virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. Male and Female offspring were used for this study. The maternal separation for six hours during periods of light or dark cycle was performed from 1st to 14th day of life. At 150 days of life, we evaluated the behavioral sequence of satiety, preference to macronutrients, reaction to palatable diet and fasting, and corticosterone levels. Related to food consumption, we observe that females submitted to maternal separation during light cycle shows increase compared to control females (CF = 8.2 ± 0.2 v.s SCF = 9.9 ± 0.3 , P <0.05). When we compare gender we observed that females has higher food consumption than males (CF = 23.3 ± 0.5 v.s CM = 18.2 ± 0.7 , P <0.001). In the test of food preference, females submitted to maternal separation shows increase in protein intake (CF = 4.1 ± 0.7 v.s SCF = 7.1 ± 0.5 , P <0.05), decrease in fat intake (CF = 17.7 ± 0.9 v.s SCF = 13 ± 1.1 , P <0.001) and no change in carbohydrate intake (CF = 15.7 ± 0.7 v.s SCF = 14.2 ± 0.8 , P > 0.05) compared to their controls. Females submitted to maternal separation shows increase in intake of palatable diet (CF = 15.41 ± 0.43 v.s SCF = 17.71 ± 0.69 , P <0.001). We observed in male rats an increase in corticosterone levels only for those separated during the dark cycle (CM = 128.4 ± 13.4 v.s $173.9 \pm SEM = 12.8$, P <0.05). For females it was observed higher corticosterone due to maternal separation independent of the light cycle (CF = 74.6 ± 8 v.s SCF = 142.7 ± 12 , P <0.001; CF = 50.5 ± 9.3 v.s SEF = 153.5 ± 8.9 , P <0.001). In this study, we observed some differences in parameters of food consumption between animals separated from their mothers during the light and dark. These results suggest that different factors involved in mother-infant interaction programming the pattern of feeding behavior in adulthood.

Keywords: stress, maternal separation, feeding behavior, food preference

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	13
OBJETIVOS	16
HIPÓTESES	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. O estresse.....	20
2.2. Estresse no período neonatal.....	24
2.3. Estresse neonatal e comportamento alimentar	26
2.3.1.Referências	27
3. MÉTODOS.....	35
3.1. Animais	35
3.2. Separação materna e formação dos grupos experimentais	36
3.3. Peso corporal e da glândula supra renal	36
3.4. Consumo Alimentar nos períodos claro/escuro	37
3.5. Seqüência Comportamental de Saciedade (SCS)	37
3.6. Preferência a macronutrientes	38
3.7. Bioquímica do sangue	38
3.8. Consumo alimentar antes e após estresse	40
3.9. Consumo após privação alimentar	40
4.0. Ansiedade Experimental.....	41
4.0. Análise Estatística	41
4. RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS.....	42
Effects of separation maternal on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats.	42
Influências de parâmetros relacionados a interação mãe-filhote sobre o consumo alimentar hedônico.....	73
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
6. REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS	104
Anexo A. Aprovação do comitê de Ética	105
Anexo B. Submissão do artigo para a Revista Behavioural Processes.....	106
Anexo C. Submissão do artigo para a Revista de Nutrição.....	107

APRESENTAÇÃO

Muitos estudos têm apontado a importância da interação mãe-filho durante os primeiros meses de vida. Em humanos, nas últimas décadas, tem sido incentivado o contato direto e contínuo entre mães e neonatos nascidos com baixo peso ou prematuros. Os benefícios da interação mãe-filho obtidos por esse método têm reduzido a mortalidade e morbidade desses neonatos, aumentando medidas de crescimento, amamentação e contato mãe-filho. Em roedores, a presença da mãe é determinante para evitar a incidência de fatores agressores que possam desencadear adaptações fenotípicas dos filhotes com consequências morfofuncionais e comportamentais irreversíveis. Essa característica é explorada em modelos experimentais de estresse neonatal utilizando a separação entre mães e filhotes na fase de lactação.

A presente tese intitulada “Estresse por separação materna: Estudo do comportamento alimentar em ratos” teve como objetivo investigar, em ratos, os efeitos da separação materna periódica na lactação sobre parâmetros do controle do comportamento alimentar na vida adulta. Este estudo está apresentado na forma de artigos científicos. O primeiro se refere a uma revisão de literatura que tem como título: Estresse Perinatal: suas características e repercussões sobre o comportamento alimentar na vida adulta. Após delineamento dos materiais e métodos utilizados, foram delineados os métodos seguidos dos resultados que foram apresentados em forma de dois artigos originais. O primeiro artigo aborda as repercussões da separação materna sobre parâmetros comportamentais da saciedade e preferência alimentar, tendo como título: **Effects of maternal separation on dietary preference and behavioral satiety sequence in rats**. O segundo artigo original, abordou os efeitos da separação materna sobre a responsividade de mecanismos de controle do comportamento alimentar a

estímulos de jejum, dieta palatável ou estresse. Neste artigo, outros fatores que envolvem a interação mãe e filhote são discutidos, bem como as diferentes adaptações relativas ao gênero. Este artigo apresenta o título: **Influências de parâmetros relacionados à interação mãe-filhote sobre o consumo alimentar hedônico.**

Algumas preocupações acerca da separação materna são manifestadas por profissionais da área de saúde. Entre os vários fatores identificados na população que levam a separação materna, destacam-se as desordens e os distúrbios alimentares como a obesidade, e os psiquiátricos como a depressão associada à ansiedade. A constatação dos efeitos possivelmente prejudiciais provocados pelo método da separação, em estudos experimentais, servem de base para as pesquisas epidemiológicas e clínicas fortalecendo a prevenção dos distúrbios alimentares e psiquiátricos.

OBJETIVOS

Geral:

Investigar, em ratos, os efeitos da separação materna periódica na lactação sobre parâmetros do controle do comportamento alimentar na vida adulta.

Específicos:

Em ratos, submetidos ou não a separação materna em diferentes períodos do ciclo circadiano, avaliar na vida adulta:

- Níveis plasmáticos de corticosterona, glicose e colesterol;
- A ingestão alimentar nos períodos claro ou escuro;
- A sequência comportamental de saciedade;
- A ingestão de dieta palatável antes e após estresse alimentar;
- A preferência a macronutrientes.

HIPÓTESES

O modelo de separação materna, como indutor de estresse perinatal, apresenta agravos mais importantes sobre parâmetros do comportamento alimentar quando esta ocorre sobre o período claro do ciclo de luminosidade;

A separação materna promove preferência alimentar a lipídios e alimentos palatáveis, bem como prejuízo temporal de mecanismos de saciedade, o que favorece aumento do consumo calórico desses animais.

REVISÃO DA LITERATURA

Título: Estresse Perinatal: suas características e repercussões sobre o comportamento alimentar na vida adulta.

Title: Perinatal stress: characteristics and effects on feeding behavior in adulthood

Título resumido: Estresse Perinatal e comportamento alimentar

Short Title: Perinatal stress on feeding behavior

Autores: ¹Matilde Cesiana da Silva, ²Ligia Cristina Monteiro Galindo Novaes, ³Raul Manhães de Castro, ⁴Sandra Lopes de Souza

¹Núcleo de Nutrição Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco – Brasil

^{2,3} Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco - Brasil

³Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco - Brasil

Contribuição dos autores:

¹Consulta as bases de dados e escrita do artigo;

⁴Escrita e revisão do artigo;

^{2,3}Revisão final do artigo.

Endereço para correspondência:

Departamento de Anatomia -Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária – Recife – PE - CEP: 50670-901Fone: (81) 2126-8567

E-mail: sanlopesufpe@gmail.com

Resumo

Muitos estudos têm apontado a importância da interação mãe-filho durante os primeiros meses de vida. Nas últimas décadas, foi desenvolvido um método, denominado mãe canguru, que tem como principal objetivo manter neonatos nascidos com baixo peso ou prematuros em contato direto com suas mães de forma contínua. Esse método tem reduzido a mortalidade e morbidade desses neonatos, aumentando medidas de crescimento, amamentação e contato mãe-filho (1). Em roedores, a presença da mãe é determinante para evitar a incidência de fatores agressores que possam desencadear adaptações fenotípicas dos filhotes com consequências morfofuncionais e comportamentais irreversíveis (2). Essa característica é explorada em modelos experimentais de estresse neonatal utilizando a separação entre mães e filhotes na fase de lactação (3). Um dos modelos mais utilizado envolve a separação repetida entre mãe e filhotes (modelo de Separação Materna, SM) e também entre filhotes (modelo da privação materna, DM) durante a lactação. Nesses modelos há efeitos críticos sobre a resposta neuroendócrina ao estresse na vida adulta (2, 6), maior vulnerabilidade a depressão, ansiedade e distúrbios do comportamento alimentar (7-8). Este revisão descreve os efeitos do estresse durante o período neonatal sobre aspectos fisiológicos gerais e particularmente sobre o controle do comportamento alimentar.

Palavras-Chaves: Estresse e comportamento alimentar

SUMMARY

Many studies have shown the importance of mother-child interaction during the first months of life. In recent decades, a method was developed, called kangaroo mother, whose main objective is to maintain infants born underweight or premature in direct contact with their mothers continuously. This method has reduced the mortality and morbidity of these newborns, increased measures of growth, breastfeeding and mother-child contact (1). In rodents, the mother's presence is crucial to prevent the incidence of aggressive factors which might trigger adaptations of offspring with phenotypic and behavioral consequences morphofunctional lesions (2). This characteristic is exploited in experimental models of neonatal stress using the separation of mothers and pups during lactation (3). This review describes the effects of stress during the neonatal period on physiological aspects of general and particularly on the control of feeding behavior. One of the most widely used models involves repeated separation between mother and offspring (maternal separation model, SM) and between young (model of maternal deprivation, MD) during lactation. In these models is critical effects on the neuroendocrine response to stress in adulthood (2, 6), increased vulnerability to depression, anxiety and eating disorders (7-8). This review describes the effects of stress during the neonatal period on physiological aspects of general and particularly on the control of feeding behavior.

Key Words- stress and food behavior

Introdução

Muitos estudos têm apontado a importância da interação mãe-filho durante os primeiros meses de vida. Nas últimas décadas, foi desenvolvido um método, denominado mãe canguru, que tem como principal objetivo manter neonatos nascidos com baixo peso ou prematuros em contato direto com suas mães de forma contínua (1). Esse método tem reduzido a mortalidade e morbidade desses neonatos, aumentando medidas de crescimento, amamentação e contato mãe-filho (2). Em roedores, a presença da mãe é determinante para evitar a incidência de fatores agressores que possam desencadear adaptações fenotípicas dos filhotes com consequências morfofuncionais e comportamentais irreversíveis (3). Essa característica é explorada em modelos experimentais de estresse neonatal utilizando a separação entre mães e filhotes na fase de lactação (4). A separação materna periódica pode desencadear má-nutrição, estresse térmico e prejuízos no contato somato-sensorial (5). Um dos modelos mais utilizados envolve a separação repetida entre mãe e filhotes (modelo de Separação Materna, SM) e também entre filhotes (modelo da deprivação materna, DM) durante a lactação. Nesses modelos há efeitos críticos sobre a resposta neuroendócrina ao estresse na vida adulta (6), maior vulnerabilidade a depressão, ansiedade e distúrbios do comportamento alimentar (7). Algumas preocupações acerca da separação materna são manifestadas por profissionais da área de saúde. Entre os vários fatores identificados na população que levam a separação materna, destacam-se as desordens e os distúrbios alimentares como a obesidade, e os psiquiátricos como a depressão associada à ansiedade. A constatação dos efeitos possivelmente prejudiciais provocados pelo método da separação, em estudos experimentais, servem de base para as pesquisas epidemiológicas e clínicas fortalecendo a prevenção dos distúrbios alimentares e psiquiátricos. Esta revisão descreve os efeitos do estresse durante o período neonatal sobre aspectos fisiológicos gerais e particularmente sobre o controle do comportamento alimentar (8).

O estresse

O estresse foi utilizado pela primeira vez em 1936 pelo médico Húngaro Hans Selye, na publicação *What is stress?* Conhecido como a Síndrome da Adaptação Geral, o estresse é uma “resposta não específica do corpo a qualquer demanda externa (9). Esta resposta é dividida em 3 etapas: alarme (identificação do agente estressor), resistência (combate ao agente estressor com sucesso) e exaustão (oriunda dos efeitos deletérios do

estresse, o organismo não consegue mais responder ao agente estressor). O agente estressor é descrito como algo que pode vir a perturbar a homeostase do organismo e, assim, requerer uma resposta fisiológica (8)

Há dois sistemas de resposta ao estresse que são classicamente descritos na literatura: a) o sistema neurovegetativo, caracterizado pela liberação de adrenalina pela medula da glândula supra-renal; B) o sistema neuroendócrino, caracterizado pela liberação de glicocorticóides produzidos pelo córtex dessa mesma glândula sob estímulo do hipotálamo e da hipófise. A ativação aguda desses sistemas é adaptativa, promovendo maior disponibilidade de energia e aporte sanguíneo aos órgãos-alvo. Contudo, uma exposição prolongada aos glicocorticoides, causada pela ativação crônica desse sistema, pode ter efeitos deletérios ao organismo (9).

Qualquer distúrbio no organismo, seja ele real ou imaginário, provoca resposta ao agente estressor com a finalidade de manter a homeostase e facilitar a adaptação. Em mamíferos, esta resposta é desencadeada pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). A típica resposta neuroendócrina ao estresse promove em segundos: a) aumento na secreção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) pelo sistema nervoso simpático; b) ativação do Núcleo Paraventricular Hipotalâmico (PVN) para expressão dos peptídeos arginina-vasopressina (AVP) e do hormônio liberador da corticotropina (CRH) e c) aumento na secreção de ocitocina (OT) pelo lobo neural da hipófise. Os neurônios do PVN projetam-se para a eminência média do hipotálamo, permitindo a liberação dos peptídeos no sistema porta hipofisário (10). Isto resulta na síntese e liberação de diversos outros peptídeos derivados de um precursor comum, a pró-opiomelanocortina (POMC). Entre estes peptídeos estão os opióides endógenos (como a β -endorfina) e o Hormônio Adrenocorticotrópico (ACTH) (10). O sistema HPA, que envolve a liberação de hormônios glicocorticoides pela adrenal (cortisol no homem e corticosterona no rato) é lento e persistente (17). Alguns minutos após o início da exposição do indivíduo ao estressor, há aumento dos níveis de glicocorticoides plasmáticos, atingindo o pico entre 30 minutos e 1 hora. O eixo HPA é um dos principais sistemas de controle da resposta psicológica aos estressores nos mamíferos. O sistema CRF (hormônio relacionado a corticotrofina) é o fator inicial para a primeira resposta neuroquímica, comportamental e endócrina ao estresse (3). O eixo HPA, quando estimulado pelo estresse, ativa o CRF no hipotálamo promovendo a liberação do ACTH pela glândula pituitária anterior, esta por sua vez, estimula a glândula supra-renal

a liberar glicocorticoides como a corticosterona em roedores e cortisol em humanos. A corticosterona apresenta mecanismo de feedback negativo na pituitária e no hipotálamo, ou seja, inibição da liberação de ACTH e do CRF (11). Os hormônios glicocorticoides são os efetores finais do eixo HPA (21). Esses hormônios defendem a homeostasia por mobilizarem estoques energéticos com catabolismo protéico, gliconeogênese e lipólise. Além disso, melhoram a função cognitiva e inibem a secreção de esteróides gonadais. O aumento agudo dos níveis de glicocorticoides provoca resposta adaptativa salutar, porém, o aumento prolongado pode ter efeitos negativos no sistema nervoso, além de outros tecidos, estando associados à dilatação ventricular, atrofia cerebral, redução na capacidade cognitiva e possível neurotoxicidade (12). Os efeitos da corticosterona são mediados por dois subtipos de receptores: mineralocorticoide e glicocorticoide que possuem maior e menor afinidade pela corticosterona respectivamente (12).

Os receptores mineralocorticóides participam do controle da excitabilidade basal e da responsividade comportamental, enquanto os receptores glicocorticoides estão envolvidos no término da resposta ao estresse. Esses receptores também agem como fatores de transcrição dependentes de ligante. Os receptores mineralocorticóides são encontrados em algumas áreas límbicas como o hipocampo, enquanto os de glicocorticoides são encontrados em várias regiões encefálicas, incluindo o córtex frontal e o PVN hipotalâmico (13). Os receptores glicocorticoides têm papel regulador chave no controle neuroendócrino do eixo HPA e no término da resposta ao estresse. Isso ocorre porque exerce retroalimentação negativa em receptores no hipotálamo, na hipófise e em estruturas do sistema límbico, tais como o hipocampo e a amígdala. A retroalimentação negativa tem dois modos de operação, o pró-ativo que envolve a manutenção de níveis basais do eixo HPA e o modo reativo que suprime os níveis de ACTH e CORT induzidos por estresse (14). O primeiro determina a sensibilidade ou limiar da resposta ao estresse e envolve funções de receptores mineralocorticoides de alta afinidade por corticosterona localizados nas regiões encefálicas superiores. O segundo, envolve receptores glicocorticoides de baixa afinidade localizados em neurônios do PVN; nas células corticotróficas hipofiseais, em abundância nas regiões corticais, no hipocampo e nas vias ascendentes aminérgicas, onde medeiam a influência modulatória da corticosterona na atividade do HPA. A ativação de receptores mineralocorticoides no hipocampo inibe a atividade do eixo HPA (14). Eferências neuronais hipocampais ativam neurônios gabaérgicos localizados na região septal

ventro-lateral e no núcleo do trato solitário (BNST), os quais projetam-se para neurônios da região parvocelular do PVN (34). A inibição realizada por esses hormônios atua como limite na sua própria ação, o que previne efeitos catabólicos, antirreprodutivos e imunossupressivos no organismo (14).

A maior incidência de depressão e outros transtornos em mulheres, está relacionada a maior vulnerabilidade ao estresse identificado no sexo feminino. O sistema nervoso apresenta especificidades por gênero nos níveis anatômico, metabólico e neuroquímico, bem como nas respostas ao estímulo emocional. Estudos clínicos têm apontado função sexualmente dimórfica do eixo HPA em condições normais ou patológicas. O sexo feminino tem maior nível basal de cortisol induzido por estresse e é mais resistente à supressão do eixo HPA por dexametasona (15).

Vários estudos em ratos têm identificado diferenças sexuais na função do eixo HPA e nas respostas as situações estressantes ou de ansiedade. Estas diferenças incluem maior responsividade do eixo HPA com elevados níveis plasmáticos, induzidos por estresse, dos hormônios ACTH e corticosterona em fêmeas. As modificações nos níveis de secreção de corticosterona não são constantes em fêmeas, variando ao longo do ciclo estral (16).

Estudos em humanos sugerem que os hormônios esteroides são os principais implicados nas diferenças sexuais de atividade do eixo HPA. Assim, foi demonstrado que o estrogênio prejudica a retroalimentação negativa dos glicocorticoides, o que potencializa a resposta ao estresse. Foi sugerido que a maior sensibilidade do eixo HPA em fêmeas está relacionada à indução da transcrição de CRH via receptor de estrogênio localizado no núcleo PVN do hipotálamo. Vale ressaltar no entanto, que as diferenças sexuais de resposta ao estresse não ocorrem apenas sobre o eixo HPA e hormônios circulantes, mas também em sistemas centrais de neurotransmissão (17).

Entre os fatores que podem modificar a responsividade do organismo ao estresse, estão experiências que incidem durante o período de rápido desenvolvimento do sistema nervoso, gestação e lactação em ratos, até os três primeiros anos de vida no homem. A separação periódica entre mães e filhotes tem sido utilizada como modelo de estresse perinatal. Na vida adulta, ratos submetidos à separação materna exibem elevada ansiedade, déficits de aprendizado e memória, aumento na expressão de CRF no PVN e hipocampo, e reduzida capacidade de ligação de glicocorticoides em receptores no

hipocampo. Além disso, a separação materna modula a neurogênese adulta no hipocampo (18).

Estresse no período neonatal

Durante o desenvolvimento neonatal, em roedores, há um período de baixa responsividade ao estresse (PHRE), no qual a resposta da glândula supra-renal ao estresse é mínima ou inexistente. As principais características desse período são a exacerbada retroalimentação negativa aos glicocorticoides no hipotálamo e na hipófise, a reduzida sensibilidade da supra-renal ao ACTH e o aumento mínimo da corticosterona em resposta a maioria dos estressores. Durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, em roedores, os níveis de corticosterona, de ACTH e CRH estão diminuídos (16). Este estágio de hiporresponsividade do HPA pode ser considerado um mecanismo adaptativo e protetor, uma vez que níveis elevados de corticosterona durante este período crítico têm efeitos deletérios e catabólicos que incluem a inibição do crescimento encefálico, da divisão neuronal, do desenvolvimento dos dendritos e do metabolismo neuronal (19).

Os receptores de glicocorticoides são funcionais no encéfalo do rato no 13º dia embrionário, sendo a retroalimentação negativa do eixo HPA por corticosterona estabelecida entre o 13º e 17º dia. No período neonatal precoce, mudanças no nível sanguíneo de corticosterona podem afetar o nível de desses receptores (20). A concentração plasmática de ACTH e corticosterona está elevada no 1º dia de vida, no entanto sofre redução considerável a partir do 2º dia, continuando baixa durante as duas primeiras semanas de vida. Os níveis desses hormônios irão alcançar valores semelhantes aos adultos no dia 21, ou seja, próximo ao desmame (20). A imaturidade da glândula supra-renal do rato em desenvolvimento é consequência da baixa síntese e/ou secreção de CRH e ACTH pela hipófise durante as primeiras semanas de vida. Durante as primeiras duas semanas de vida, no rato, a saturação dos receptores de glicocorticoides da hipófise pode estar associada com elevado grau de inibição da liberação de ACTH (21). Durante o PHRE, a circulação da corticosterona livre é elevada e pode ter acesso aos tecidos, especialmente aos corticotrofos, os quais podem contribuir para a sensibilidade aumentada da retroalimentação durante esse período (19). Em adição, os glicoreceptores podem agir em nível supra-hipofiseal para inibir a síntese e/ou secreção de CRH e AVP. Acredita-se que baixos níveis de glicocorticoides

circulantes durante as duas primeiras semanas de vida sejam essenciais para o desenvolvimento encefálico normal. Os glicocorticoides são importantes para a maturação normal do encéfalo, pois iniciam a maturação terminal, remodelam axônios e dendritos e afetam a sobrevivência celular. O efeito e o aumento dos níveis de glicocorticoides prejudicam o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (22).

A administração de glicocorticoides nas ratas gestantes, retarda a maturação de neurônios e mielinização alterando a estrutura neuronal, a formação de sinapses e a neurogênese. (23)

Apesar da existência do PHRE, vários estudos mostram alterações neuroquímicas e comportamentais que podem ser observadas ao longo da vida quando há exposição a agentes estressores nesse período. Embora “hiporresponsivos”, esses indivíduos respondem agudamente ao estresse promovido pela separação de suas mães mesmo quando não expostos a nenhum outro estressor adicional (24). Durante essa fase, os níveis de transcortina (proteína transportadora de glicocorticoides) são baixos e a maior parte do glicocorticoide circula no plasma nas suas formas não-ligadas, ou seja, biologicamente ativo (25). Portanto, apesar da concentração plasmática total de glicocorticoide ser baixa durante o PHRE, a concentração de sua forma ativa é alta, o que é suficiente para suas ações biológicas. Esse também deve ser o mecanismo pelo qual ocorre o papel programador do estresse sobre o sistema nervoso e expressão comportamental. Em ratos no final da segunda semana de vida, o sistema HPA amadurece, com aumento gradual dos níveis de corticosterona basal e responsividade ao estresse (MEANEY *et al.*, 1985). Há estreita relação entre o desenvolvimento do eixo HPA, o ambiente e o estabelecimento de padrões adultos de comportamento (26).

Em ratos, a separação materna durante alguns períodos na lactação (modelo de estresse neonatal) promove na vida adulta ansiedade, déficits de aprendizagem e memória (27), aumento na expressão de fator de liberação de corticotropina (CRF) no núcleo paraventricular do hipotálamo e no hipocampo, e redução na ligação de receptores de glicocorticoides (28). Variações nos cuidados recebidos por suas mães em ratos lactentes tem impacto sobre a regulação gênica, número de neurônios, níveis de neurotransmissores e na função neuroendócrina e comportamental em resposta ao estresse. O aumento no cuidado materno está associado a redução da reatividade ao estresse de ratos na vida adulta, incluindo redução de comportamento de ansiedade e

diminuído tônus do eixo HPA e responsividade ao estresse (29).

Em humanos, a estimulação tátil passiva e ativa em bebês prematuros melhora o desenvolvimento comportamental, função visceral e maturação simpato-adrenal (30).

Estresse neonatal e comportamento alimentar

O comportamento alimentar representa uma resposta adaptativa, decorrente da demanda do ambiente interno sendo modulado por oportunidades e limitações impostas pelo ambiente externo. Esse comportamento é regulado por uma interação complexa entre mecanismos periféricos e centrais que controlam a fome e a saciedade (31). O hipotálamo é a estrutura encefálica que integra sinais centrais e periféricos para regular a homeostase energética e o peso corporal (32). Nos núcleos hipotalâmicos são encontrados peptídeos orexigênicos como o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene Agouti (AgRP), e os anorexigênicos como o transcrito relacionado a cocaína e anfetamina (CART) e a pró-opiomelanocortina (POMC) (66). Várias substâncias periféricas atuam sobre neurônios produtores desses peptídeos para influenciar o comportamento alimentar (33). Entre essas podemos mencionar hormônios envolvidos na resposta a agentes estressores.

O estresse promove importantes ajustes no metabolismo energético. Indivíduos submetidos a situação de estresse apresentam redução do consumo alimentar, do peso corporal e aumento no gasto energético (34). No entanto, quando o alimento é densamente energético ou palatável, o estresse promove aumento no seu consumo (35). Em teste de preferência alimentar, ocorre maior consumo de lipídios por indivíduos estressados (36). Os glicocorticoides podem ser os responsáveis pela indução da preferência por alimentos palatáveis. A remoção dos glicocorticoides por adrenalectomia reduz o consumo alimentar em 10 a 20% diminuindo o ganho de peso (37).

O estresse neonatal promove ajustes no controle do comportamento alimentar em resposta as diferentes demandas na vida adulta, uma vez que a disfunção do eixo HPA esta relacionada as patogêneses das desordens alimentares (38). Ratos que foram separados de suas mães apresentam maior vulnerabilidade para desenvolvimento de anorexia nervosa. Em pacientes com desordens alimentares é prevalente a existência de experiências de abuso na infância, sendo a disfunção do HPA implicada nesta

patofisiologia (39). Muitos pacientes com desordens alimentares relatam terem sido vítimas de abuso na infância. Um estudo com pacientes de bulimia nervosa apontou que muitos tinham pais que viviam separados, divorciados ou em luto (40). E outro estudo, foi relatado que pacientes de bulimia nervosa apresentavam histórico de abuso sexual na infância mais que pacientes com anorexia nervosa (40).

Em modelo experimental de estresse neonatal, não são muitos os estudos que descrevem as suas repercussões sobre mecanismos que controlam o comportamento alimentar. Em ratos o consumo alimentar na vida adulta não foi modificado por separação materna, no entanto, quando esses animais foram submetidos a ciclos de restrição alimentar, apresentaram hiperfagia de rebote (41).

A experiência de separação materna promoveu aumento do consumo alimentar em ratos adolescentes em resposta a ciclos sucessivos de restrição e realimentação, possivelmente devido ao aumento da responsividade do eixo HPA. Os ratos são considerados adolescentes aos 60 dias quando atingem a maturidade sexual (42).

Os glicocorticoides estão envolvidos na regulação do balanço energético com efeitos sobre neuropeptídeos hipotalâmicos (43). Neurônios que expressam NPY no núcleo arqueado do hipotálamo apresentam receptores de glicocorticoides. Níveis elevados de corticosterona no plasma parece ser necessário para o aumento na expressão de mRNA NPY (44).

Animais que sofreram desnutrição perinatal, um tipo de estresse, apresentam hiperfagia associada ao aumento nos níveis de peptídeos hipotalâmicos que estimulam a fome (NPY) e redução daqueles que a inibem (POMC) (45), bem como modificações no controle serotoninérgico da saciedade (46). A separação materna aumenta os níveis basais de NPY hipotalâmico (47), por outro lado, inibe esse aumento em resposta ao jejum (48). Os níveis basais de peptídeos hipotalâmicos anorexigênicos, como o POMC e CART e orexigênico como o NPY, não são alterados por separação materna em ratas fêmeas jovens (49). No entanto, quando essas ratas foram submetidas a jejum de 48 horas, foi observado efeito da separação materna sobre a expressão desses neuropeptídios, com aumento para o NPY e redução de POMC e CART (50). Neste estudo, observamos algumas diferenças em parâmetros do consumo alimentar entre animais separados de suas mães durante o período claro e escuro. Essa revisão indica

que diferentes fatores envolvidos na interação mãe-filho apresentam influências programadoras distintas sobre o padrão do comportamento alimentar na vida adulta.

REFERÊNCIAS

1. Conde-Agudelo A, Belizan JM, Diaz-Rossello J. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(3):CD002771.
2. Caldji C, Diorio J, Meaney MJ. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry*. 2000 Dec 15;48(12):1164-74.
3. Ruedi-Bettschen D, Feldon J, Pryce CR. Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects? *Dev Psychobiol*. 2004 Sep;45(2):59-71.
4. Hofer MA, Brunelli SA, Shair HN. Potentiation of isolation-induced vocalization by brief exposure of rat pups to maternal cues. *Dev Psychobiol*. 1994 Dec;27(8):503-17.
5. Orozco-Solis R, Matos RJ, Lopes de Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhaes de Castro R, et al. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Jul;35(7):990-1000.
6. Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci*. 2000 Aug;3(8):799-806.
7. Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res*. 2000;122:81-103.
8. El Khoury A, Gruber SH, Mork A, Mathe AA. Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006 May;30(3):535-40.
9. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1998 Spring;10(2):230-1.
10. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 2):R1247-55.
11. Kopin IJ. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec 29;771:19-30.
12. McEwen BS. The neurobiology and neuroendocrinology of stress. Implications for post-traumatic stress disorder from a basic science perspective. *Psychiatr Clin North Am*. 2002 Jun;25(2):469-94, ix.

13. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002 Oct;53(4):865-71.
14. Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Scribner KS, Pecoraro N, La Fleur SE, et al. Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1018:141-50.
15. O'Callaghan JP, Miller DB. Spinal glia and chronic pain. *Metabolism.* 2010 Oct;59 Suppl 1:S21-6.
16. Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Spencer RL, Watkins LR, Maier SF. Prior stressor exposure primes the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology.* 2002 Apr;27(3):353-65.
17. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 1998 Jun;19(3):269-301.
18. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000 Feb;21(1):55-89.
19. Van de Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 1999 Jan;20(1):1-48.
20. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993 May;18(3):195-200.
21. Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001 Sep;30(3):695-728; vii-viii.
22. Phillips GB. Endogenous sex hormones and type 2 diabetes risk. *JAMA.* 2006 Jul 12;296(2):168-9; author reply 9-70.
23. Meijer OC, de Kloet ER. Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol.* 1998;12(1-2):1-20.
24. Meijer OC, Kortekaas R, Oitzl MS, de Kloet ER. Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT(1A) receptor-mediated behavioural responses. *Eur J Pharmacol.* 1998 Jun 12;351(1):7-14.
25. Tritos N, Kitraki E, Philippidis H, Stylianopoulou F. Neurotransmitter modulation of glucocorticoid receptor mRNA levels in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology.* 1999 May;69(5):324-30.
26. Evans RM, Arriza JL. A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron.* 1989 Feb;2(2):1105-12.

27. Gesing A, Bilang-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci*. 2001 Jul 1;21(13):4822-9.
28. Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*. 1991 May;12(2):118-34.
29. de Kloet ER, Reul JM, de Ronde FS, Bloemers M, Ratka A. Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuropeptides. *J Steroid Biochem*. 1986 Nov;25(5B):723-31.
30. de Kloet ER. Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol*. 1995 Oct;16(4):416-25.
31. Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci*. 1996;18(1-2):49-72.
32. Reul JM, Sutanto W, van Eekelen JA, Rothuizen J, de Kloet ER. Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. *Adv Exp Med Biol*. 1990;274:243-56.
33. Van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci*. 1998 Dec 1;18(23):10171-9.
34. Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(3-4):371-94.
35. Curtis AL, Bethea T, Valentino RJ. Sexually dimorphic responses of the brain norepinephrine system to stress and corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Mar;31(3):544-54.
36. Duchesne A, Dufresne MM, Sullivan RM. Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Mar 17;33(2):251-61.
37. Young EA. Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease. *J Gend Specif Med*. 1998 Sep;1(1):21-7.
38. Klein LC, Corwin EJ. Seeing the unexpected: how sex differences in stress responses may provide a new perspective on the manifestation of psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep*. 2002 Dec;4(6):441-8.
39. Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol*. 2005 Apr;69(1):113-32.
40. Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav*. 2001 Jun;73(3):261-71.

41. Karandrea D, Kittas C, Kitraki E. Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress. *Neuroendocrinology*. 2000 Jun;71(6):343-53.
42. Karandrea D, Kittas C, Kitraki E. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology*. 2002 Apr;75(4):217-26.
43. Beiko J, Lander R, Hampson E, Boon F, Cain DP. Contribution of sex differences in the acute stress response to sex differences in water maze performance in the rat. *Behav Brain Res*. 2004 May 5;151(1-2):239-53.
44. Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL. Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol*. 2004 Dec;16(12):989-98.
45. Johnston AL, File SE. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav*. 1991 Feb;49(2):245-50.
46. Mendelson SD, McEwen BS. Autoradiographic analyses of the effects of restraint-induced stress on 5-HT1A, 5-HT1C and 5-HT2 receptors in the dorsal hippocampus of male and female rats. *Neuroendocrinology*. 1991 Nov;54(5):454-61.
47. Viau V, Meaney MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*. 1991 Nov;129(5):2503-11.
48. Imhof JT, Coelho ZM, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behav Brain Res*. 1993 Sep 30;56(2):177-80.
49. Burgess LH, Handa RJ. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology*. 1992 Sep;131(3):1261-9.
50. Lunga P, Herbert J. 17Beta-oestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptations to repeated restraint stress in female rats. *J Neuroendocrinol*. 2004 Sep;16(9):776-85.
51. Luine VN, Beck KD, Bowman RE, Frankfurt M, Maclusky NJ. Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. *J Neuroendocrinol*. 2007 Oct;19(10):743-51.
52. Miller VM, Tindall DJ, Liu PY. Of mice, men, and hormones. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):995-7.
53. Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J Clin Invest*. 1993 Oct;92(4):1896-902.

54. Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci*. 2000;11(4):383-408.
55. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Apr;32(3):256-66.
56. Enthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS. Differential development of stress system (re)activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care. *Brain Res*. 2008 Jun 27;1217:62-9.
57. Avishai-Eliner S, Eghbal-Ahmadi M, Tabachnik E, Brunson KL, Baram TZ. Down-regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience-induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA. *Endocrinology*. 2001 Jan;142(1):89-97.
58. Ladd CO, Huot RL, Thirvikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry*. 2004 Feb 15;55(4):367-75.
59. Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci*. 2004 Aug;7(8):841-6.
60. Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav*. 2001 Jun;73(3):255-60.
61. Vazquez DM. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*. 1998 Oct;23(7):663-700.
62. Suchecki D, Nelson DY, Van Oers H, Levine S. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology*. 1995;20(2):169-82.
63. da SBC, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, et al. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res*. 2007 Oct;62(4):405-11.
64. Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny LJ, Tatarewicz JE, Sapolsky RM. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav Neurosci*. 1985 Aug;99(4):765-70.
65. Kitraki E, Alexis MN, Papalopoulou M, Stylianopoulou F. Glucocorticoid receptor gene expression in the embryonic rat brain. *Neuroendocrinology*. 1996 Apr;63(4):305-17.
66. Angelucci L, Patacchioli FR, Chierichetti C, Laureti S. Perinatal mother-offspring pituitary-adrenal interrelationship in rats: corticosterone in milk may affect adult life. *Endocrinol Exp*. 1983 Oct;17(3-4):191-205.

67. Chatelain P, Penhoat A, Perrard-Sapori MH, Jaillard C, Naville D, Saez J. Maturation of steroidogenic cells: a target for IGF-I. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1988;347:104-9.
68. Walker CD, Perrin M, Vale W, Rivier C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology.* 1986 Apr;118(4):1445-51.
69. Sakly M, Koch B. Ontogenesis of glucocorticoid receptors in anterior pituitary gland: transient dissociation among cytoplasmic receptor density, nuclear uptake, and regulation of corticotropic activity. *Endocrinology.* 1981 Feb;108(2):591-6.
70. Grino M, Boudouresque F, Chautard T, Becquet D, Guillaume V, Strbak V, et al. Developmental aspects of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Endocr Regul.* 1991 Jun;25(1-2):36-43.
71. Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 1986 Mar;396(1):64-76.
72. Meaney MJ, Stewart J, Poulin P, McEwen BS. Sexual differentiation of social play in rat pups is mediated by the neonatal androgen-receptor system. *Neuroendocrinology.* 1983 Aug;37(2):85-90.
73. Fukumoto K, Morita T, Mayanagi T, Tanokashira D, Yoshida T, Sakai A, et al. Detrimental effects of glucocorticoids on neuronal migration during brain development. *Mol Psychiatry.* 2009 Dec;14(12):1119-31.
74. Husum H, Mathe AA. Early life stress changes concentrations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in adult rat brain. Lithium treatment modifies these changes. *Neuropsychopharmacology.* 2002 Nov;27(5):756-64.
75. Kuhn CM, Pauk J, Schanberg SM. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev Psychobiol.* 1990 Jul;23(5):395-410.
76. Henning SJ. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol.* 1978 Nov;235(5):E451-6.
77. Repetti RL, Taylor SE, Seeman TE. Risky families: family social environments and the mental and physical health of offspring. *Psychol Bull.* 2002 Mar;128(2):330-66.
78. Nemeroff CB. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry.* 1996 Sep;1(4):336-42.
79. Enthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS. Effects of maternal deprivation of CD1 mice on performance in the water maze and swim stress. *Behav Brain Res.* 2008 Feb 11;187(1):195-9.
80. Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1161-92.

81. Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL, Meaney MJ. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur J Neurosci*. 2003 Nov;18(10):2903-9.
82. Plotsky PM, Thrivikraman KV, Meaney MJ. Central and feedback regulation of hypothalamic corticotropin-releasing factor secretion. *Ciba Found Symp*. 1993;172:59-75; discussion -84.
83. Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Dec;30(12):2192-204.
84. Feldman R, Eidelman AI. Direct and indirect effects of breast milk on the neurobehavioral and cognitive development of premature infants. *Dev Psychobiol*. 2003 Sep;43(2):109-19.
85. Feldmann J, Middleman AB. Adolescent sexuality and sexual behavior. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2002 Oct;14(5):489-93.
86. Nguyen QT, Kleinfeld D. Positive feedback in a brainstem tactile sensorimotor loop. *Neuron*. 2005 Feb 3;45(3):447-57.
87. Blundell JE, Rogers PJ, Hill AJ. Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating. *Brain Res Bull*. 1985 Oct;15(4):371-6.
88. York DA. Peripheral and central mechanisms regulating food intake and macronutrient selection. *Obes Surg*. 1999 Oct;9(5):471-9.
89. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*. 1999 Feb;20(1):68-100.
90. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, et al. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*. 1998 Dec 28;402(4):442-59.
91. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*. 1998 May 7;393(6680):72-6.
92. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2001 Jan;26(1):37-49.
93. Laugero KD, Gomez F, Manalo S, Dallman MF. Corticosterone infused intracerebroventricularly inhibits energy storage and stimulates the hypothalamo-pituitary axis in adrenalectomized rats drinking sucrose. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4552-62.

94. Harris RB, Kelso EW, Flatt WP, Bartness TJ, Grill HJ. Energy expenditure and body composition of chronically maintained decerebrate rats in the fed and fasted condition. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1365-76.
95. Sekino A, Ohata H, Mano-Otagiri A, Arai K, Shibasaki T. Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 Oct;176(1):30-8.
96. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11696-701.
97. Bell ME, Bhatnagar S, Akana SF, Choi S, Dallman MF. Disruption of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress. *J Neurosci*. 2000 Sep 1;20(17):6707-13.
98. Koo-Loeb JH, Costello N, Light KC, Girdler SS. Women with eating disorder tendencies display altered cardiovascular, neuroendocrine, and psychosocial profiles. *Psychosom Med*. 2000 Jul-Aug;62(4):539-48.
99. Putignano P, Dubini A, Toja P, Invitti C, Bonfanti S, Redaelli G, et al. Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. *Eur J Endocrinol*. 2001 Aug;145(2):165-71.
100. Gluck ME, Geliebter A, Lorence M. Cortisol stress response is positively correlated with central obesity in obese women with binge eating disorder (BED) before and after cognitive-behavioral treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1032:202-7.
101. Hancock S, Grant V. Early maternal separation increases symptoms of activity-based anorexia in male and female rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 2009 Jul;35(3):394-406.
102. Wonderlich SA, Brewerton TD, Jolic Z, Dansky BS, Abbott DW. Relationship of childhood sexual abuse and eating disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997 Aug;36(8):1107-15.
103. Rorty M, Yager J, Rossotto E. Childhood sexual, physical, and psychological abuse in bulimia nervosa. *Am J Psychiatry*. 1994 Aug;151(8):1122-6.
105. Vize CM, Cooper PJ. Sexual abuse in patients with eating disorder, patients with depression, and normal controls. A comparative study. *Br J Psychiatry*. 1995 Jul;167(1):80-5.
106. Herzog DB. Bulimia in the adolescent. *Am J Dis Child*. 1982 Nov;136(11):985-9.
107. Fallon BA, Sadik C, Saoud JB, Garfinkel RS. Childhood abuse, family environment, and outcome in bulimia nervosa. *J Clin Psychiatry*. 1994 Oct;55(10):424-8.

108. Iwasaki S, Inoue K, Kiriike N, Hikiji K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol Behav.* 2000 Sep 15;70(5):551-6.
109. Ryu V, Lee JH, Yoo SB, Gu XF, Moon YW, Jahng JW. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Int J Obes (Lond).* 2008 Sep;32(9):1355-62.
110. Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol.* 1995 Jan;268(1 Pt 2):R142-9.
111. Cavagnini F, Croci M, Putignano P, Petroni ML, Invitti C. Glucocorticoids and neuroendocrine function. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Jun;24 Suppl 2:S77-9.
112. Tempel DL, Leibowitz SF. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol.* 1994 Oct;6(5):479-501.
113. Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, et al. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes.* 1999 Feb;48(2):365-70.
114. Cintra A, Fuxe K, Solfrini V, Agnati LF, Tinner B, Wikstrom AC, et al. Central peptidergic neurons as targets for glucocorticoid action. Evidence for the presence of glucocorticoid receptor immunoreactivity in various types of classes of peptidergic neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;40(1-3):93-103.
115. Ponsalle P, Srivastava LS, Uht RM, White JD. Glucocorticoids are Required for Food Deprivation-Induced Increases in Hypothalamic Neuropeptide Y Expression. *J Neuroendocrinol.* 1992 Oct;4(5):585-91.
116. Makimura H, Mizuno TM, Isoda F, Beasley J, Silverstein JH, Mobbs CV. Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. *BMC Physiol.* 2003 Jul 9;3:5.
117. Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 2009 Mar 2;96(3):481-92.
118. Orozco-Solis R, Matos RJ, Guzman-Quevedo O, Lopes de Souza S, Bihouee A, Houlgatte R, et al. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One.* 2010;5(10):e13537.
119. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhaes de Castro R, Bolanos-Jimenez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.* 2008 Mar;27(6):1400-8.

120. Kim HJ, Lee JH, Choi SH, Lee YS, Jahng JW. Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides*. 2005 Dec;39(6):587-94.

121. Yoo SB, Ryu V, Park EY, Kim BT, Kang DW, Lee JH, et al. The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides*. 2011 Oct;45(5):343-9.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* com idades entre 0 e 180 dias provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As fêmeas nulíparas com peso entre 250 e 300 g foram mantidas em Biotério de experimentação com temperatura de 23° (± 1), claro - escuro de 12-12h ciclo invertido (com luzes acesas às 18h), com 15 dias para adaptação, e livre acesso à água e a dieta padrão do biotério (Purina do Brazil/ SA). O manejo e os cuidados seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo 23076.022943/2008-71). Após adaptação foram realizados acasalamentos na proporção de duas fêmeas (nulíparas) para um macho, assim que foi constatada a gestação, por aumento do peso corporal, as fêmeas foram acomodadas em gaiolas individuais onde permaneceram com água e dieta ad libitum até o nascimento dos filhotes. O dia de nascimento foi considerado o dia 0, sendo a manipulação para redução da ninhada realizada no 1° dia de vida ficando os filhotes machos e fêmeas com 6-8 g de peso. Após a separação cada ninhada foram constituída de oito ratos (machos e fêmeas em proporções equivalentes 4:4). Aos 25°

dia os animais foram desmamados e mantidos em caixas com dois animais cada com fêmeas separadas dos machos, com livre acesso a dieta padrão e água.

Separação materna e formação dos grupos experimentais.

Os grupos experimentais foram delineados de acordo com a incidência de estresse e com o período do ciclo de luminosidade no qual foi realizada a separação materna. Esta consistiu da separação entre mães e filhotes durante período de seis horas do primeiro ao décimo quarto dias de vida. Cada ninhada foi constituída por oito filhotes de ambos sexos em proporções equivalentes. Durante o período de separação, os filhotes foram mantidos em incubadoras com características da gaiola original, com temperatura controlada de 30-32°C graus (Plotsky et al 1993). O grupo controle foi constituído por ninhadas que não foram manipuladas, exceto para pesagem semanal e limpeza das gaiolas. Os cuidados maternos variam de intensidade de acordo com os períodos do ciclo circadiano, sendo mais intensos durante o ciclo claro. Para analisar as possíveis variáveis a serem analisadas devido à intensidade dos cuidados maternos, realizamos a separação entre mães e filhotes no período claro e escuro do ciclo de luminosidade. Foram assim formados os grupos de ratos de separação materna no claro (SC) ou no escuro (SE). Considerando o gênero, esses grupos foram subdivididos em fêmeas separadas no claro (SCF) ou escuro (SEF), e machos separados no claro (SCM) ou escuro (SEM). Após o desmame, os animais foram agrupados em gaiolas separadas por sexo, com quatro animais cada até a idade adulta. Os filhotes de cada ninhada foram distribuídos nas várias análises realizadas para evitar o efeito ninhada.

Peso corporal

O peso corporal de todos os animais foi aferido aos 14, 30, 120 e 180 dias de vida.

Consumo alimentar nos períodos claro/escuro

Para analisar o consumo alimentar, os animais foram separados em gaiolas individuais aos 110 dias de vida. Após sete dias de adaptação, o consumo alimentar (g) foi calculado a cada 12 horas de ciclo claro ou escuro. Esta análise foi realizada por cinco dias consecutivos, e os resultados foram representados pela média de consumo de cada animal em cada período do ciclo de luminosidade durante os dias de teste.

Sequência Comportamental de Saciedade (SCS)

Esta análise foi realizada ao 150^o dia de vida. A análise da SCS foi determinada e escrita por Halford et al (1998). Os animais foram mantidos em privação alimentar prévia de cinco horas antes da oferta de alimento com peso conhecido. A SCS foi registrada por sistema de filmagem acoplado a computador em sala vizinha por uma hora. Os filmes foram analisados por um observador treinado, que registrou a duração (segundos) dos seguintes comportamentos: a) Alimentação: Registro iniciado quando o rato foi observado junto ao comedouro quantificando a ingestão de ração. O mesmo foi finalizado no momento em que o rato abandonou o comedouro. b) Limpeza: O rato procedeu inicialmente o lambar de patas anteriores e movimentos dessas sobre a cabeça continuando-se com o lambar da região ventral, do dorso e das patas posteriores. c) Repouso: O rato foi observado em posição de descanso, apresentando o corpo repousado sobre o assoalho da gaiola. Outras medidas registradas: consumo alimentar (diferença do peso entre a quantidade (g) de ração oferecida e rejeitada durante o período de uma hora do registro da SCS) e taxa de alimentação (g/min).

Preferência a Macronutrientes

Esta análise foi realizada aos 180 dias de vida. Após sete dias de adaptação as gaiolas individuais, foram introduzidas em cada gaiola três recipientes contendo em cada um dieta lipídica ou glicídica ou protéica (Tabela 1). Os recipientes em acrílico foram posicionados em uma base retangular fixa ao assoalho da gaiola e permaneceram na caixa durante o período de adaptação do animal, porém sem nenhuma dieta. Essa plataforma permitiu a mudança diária de posicionamento dos recipientes com as diferentes dietas diariamente, para evitar o fator aprendizado espacial. O consumo (g) de cada dieta foi obtido pela diferença entre a cota oferecida e a rejeitada diariamente por cinco dias consecutivos. Os resultados representam a média de consumo de cada dieta por animal nos cinco dias de análise.

Bioquímica do sangue

Aos 180 dias de idade, os animais foram rapidamente decapitados para coleta de 1ml de sangue. O sangue foi centrifugado em seguida a 10.000 RPM por 10 minutos para obtenção do plasma. Neste foram realizadas as dosagens de HDL, glicose, proteínas totais, colesterol e triglicerídeos pelo método enzimático (LABTEST®).

TABELA 1- Composições das dietas experimentais utilizadas no estudo da preferência alimentar.

Composição (100g)	Dieta proteica	Dieta glicídica	Dieta lipídica
Óleo De Soja	10,0g	10,0g	10,0g
Banha	0,0g	0,0g	29,5g
Caseína	48,5g	20,0g	20,0g
Amido De Milho	21,4g	39,9g	20,4g
Sacarose	10,0g	20,0g	10,0g
Minerais	3,5g	3,5g	3,5g
Vitaminas	1,0g	1,0g	1,0g
Celulose	5,0g	5,0g	5,0g
DL-Metionina	0,3g	0,3g	0,3g
Bitartarato De Colina	0,3g	0,3g	0,3g
Total	100,0g	100,0g	100,0g
% proteína	41,2	17	17
% carboidrato	31,0	55	27,7
% lipídeos	10	10	39,5
Kcal	378,8	378,8	534,3

TABELA 2- Composição da dieta experimental utilizada no estudo do estresse alimentar.

COMPOSIÇÃO (100g)	DIETA PALATÁVEL
Maisena	12,7
Farinha de trigo	15,0
Biscoito maisena	7,2
Farinha de soja	10,0
Caseína	19,6
Celulose	1,2
Goma aguar	0,5
Óleo de soja	6,0ml
Banha	4,0
Margarina	4,2
Açúcar	17,0
Sais	15,0
Vitaminas	0,5
Colina	0,2
Metionina	0,2
BHT	0,14 mg
% proteína	21,0
% carboidrato	46,0
% lipídeos	33,0
FIBRAS	0,51
Kcal	411,2

Consumo alimentar antes e após estresse

Quando completaram as idades 120 e 150 dias de vida, os ratos dos grupos controle e separação materna foram alocados em gaiolas individuais para adaptação ao isolamento por dez dias. Logo após esse período, foram inseridos em suas gaiolas 30g de dieta palatável. Considerou-se a quota ingerida de alimento (g) através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada, no período de uma hora.

Para analisar a resposta ao estresse, um outro grupo de animais, após a adaptação ao isolamento, foi submetido ao estresse alimentar. Durante este período, diariamente, no horário das 12:00 às 13:00 h, foi introduzido um recipiente (dimensões: 24,0x 10,0 cm) contendo 30 g de dieta palatável para que houvesse adaptação ao alimento. No 11º dia de isolamento, os ratos foram submetidos à privação alimentar durante quatro horas, com livre acesso à água. Após este período de jejum, o estresse alimentar foi induzido através da introdução de dieta palatável em recipiente que não permitia a alimentação do animal. Dessa forma, o animal em jejum obteve apenas informações visuais e olfativas do alimento durante vinte minutos. Passados os vinte minutos de estresse, os animais tiveram acesso à dieta durante uma hora e, em seguida, foi aferida a ingestão alimentar. A ingestão alimentar (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada.

Consumo após privação alimentar

Após a adaptação, ratos foram submetidos à privação alimentar de oito horas. Após o período de privação, foram inseridos em suas gaiolas 30 g de dieta padrão de biotério (Labina-Purina do Brasil/AS). O consumo alimentar foi quantificada após o período de uma hora. A quota ingerida (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada.

Ansiedade experimental

O teste para avaliação da ansiedade foi realizado nos animais com idades entre 120 e 150 dias, entre 12h00 e 14h00, foi utilizado o modelo do labirinto elevado em cruz (Silveira, Portella *et*

al., 2004). O labirinto elevado em cruz constituídos de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x10x 40 cm) e se estende a partir de uma plataforma central comum (10x10cm) com piso e paredes escuros, elevado a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso e iluminado sob uma luz vermelha de baixa voltagem (15 w) acima da área central. Este modelo experimental é baseado no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados. A realização do teste consistiu em colocar os animais, individualmente, no espaço central do aparelho, com a cabeça voltada para o braço fechado e posterior filmagem durante 5 min. Os registros foram realizados por aquisição das imagens por câmera com sistema infravermelho e armazenados em computador. Apenas um avaliador, sem conhecimento dos grupos experimentais, observou os filmes e registrou em protocolo o tempo de permanência e o número de entradas em cada braço. O registro de cada entrada teve validade, a partir do momento que o animal encontrou-se com as 4 patas (2 anteriores e/ 2 posteriores) em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado através de um cronômetro digital . A proporção e a percentagem do total de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos foram utilizados como índice de ansiedade.

Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM), com exceção das tabelas que foram expressas em média \pm desvio padrão. Nas comparações dos diferentes grupos, foi empregada a ANOVA com diferença significativa ($p < 0,05$). Quando a ANOVA revelou diferença significativa, utilizou o teste de Bonferroni's para comparações múltiplas.

RESULTADOS

Os resultados dessa tese serão apresentados no formato de dois artigos originais

1^o Artigo: Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats

Authors: Matilde Cesiana da Silva ^{a, *}, Juliet Araújo de Souza ^b, Lisiane Oliveira dos Santos ^a, Tercya Lúci de Araújo Silva ^b, Isabeli Lins Pinheiro ^c, Tássia Karin Ferreira Borba ^b, Raul Manhães de Castro ^c, Sandra Lopes de Souza ^b.

^aAcademic Center of Victoria University of Pernambuco, Vitoria de Santo Antao, Pernambuco, Brazil

^bDepartment of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

^c Nutrition Department - Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

*Mailing address: Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Rua Prof Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife, Pernambuco- Brazil CEP:50670901Brazil. Phone: 558121268555; Email: Sanlopesufpe@gmail.com.

Abstract

This present study investigated the effects of the maternal separation on feeding behavior aspects. A maternal separation model was used on postnatal day 1 (PND1), forming groups: Maternal Separation (SM) - pups separated from their mothers each day over PNP1-14 and Control (C) - pups were kept with their mothers. Another subdivision formed the subgroups: control dark and light female and male (CF and CM); maternal separation dark and light female and male (SDF and SDM) and (SLF and SLM), respectively. Female had higher calories intake relative to body weight compared to male controls only in the dark period (CF=23.3±0.5, v.s CM= 18.2 ±0.7, P<0.001). Feeding preference macronutrients showed that males had higher calories intake from protein diet as compared to females (CF= 4.1±0.7, n=8 v.s CM= 7.0±0.5, P<0.05) and de satiety development wasn't interrupted. Females had higher adrenal weight as compared to males independently of experimental groups and exhibited increased concentration of serum triglycerides (P<0.001). The study indicates possible phenotypic adjustments in the structure of feeding behavior promoted by maternal separation, especially with separating in dark cycle. This dissociation between mother's presence and milk intake probably acts as factors that induce adjustments in adulthood feeding behavior.

Keywords - maternal separation, feeding behavior, Feeding preference macronutrients

Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats

Authors: Matilde Cesiana da Silva ^{a, *}, Juliet Araújo de Souza ^b, Lisiane Oliveira dos Santos ^a, Tercya Lúci de Araújo Silva ^b, Isabeli Lins Pinheiro ^c, Tássia Karin Ferreira Borba ^b, Raul Manhães de Castro ^c, Sandra Lopes de Souza ^b.

^aAcademic Center of Victoria University of Pernambuco, Vitoria de Santo Antao, Pernambuco, Brazil

^bDepartment of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

^c Nutrition Department - Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

*Mailing address: Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Rua Prof Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife, Pernambuco- Brazil CEP:50670901Brazil. Phone: 558121268555; Email: Sanlopesufpe@gmail.com.

Abstract

This study investigated the effects of maternal separation on the feeding behavior of rats. A maternal separation model was used on postnatal day 1 (PND1), forming the following groups: in the Maternal Separation (SM) group pups were separated from their mothers each day from PND1 to PND14, while in the Control (C) group pups were kept with their mothers. Subgroups were formed to study the effects of light and darkness: control with dark and light exposure, female and male (CF and CM), and maternal separation with dark and light exposure, female and male (SDF, SDM, SLF and SLM). Females had higher caloric intake relative to body weight compared to male controls in the dark period only (CF=23.3±0.5 v.s CM=18.2±0.7, P<0.001). Macronutrient feeding preferences were observed, with males exhibiting higher caloric intake from a protein diet as compared to females (CF= 4.1±0.7, n=8 vs. CM= 7.0±0.5, n=8 P<0.05) and satiety development was not interrupted. Females had a higher adrenal weight as compared to males independently of experimental groups and exhibited a higher concentration of serum triglycerides (P<0.001). The study indicates possible phenotypic adjustments in the structure of feeding behavior promoted by maternal separation, especially in the dark cycle. The dissociation between the mother's presence and milk intake probably induce adjustments in feeding behavior during adulthood.

Keywords - maternal separation, feeding behavior, macronutrient feeding preferences

1.0 Introduction

During the lactation period in rodents, the mother's presence is crucial to prevent the incidence of aggressive factors that might trigger offspring adaptations with irreversible phenotypic, behavioral and morphological and functional consequences (Caldji, Diorio et al. 2000). Experimental models have been developed to study the impact of separation between mothers and pups during lactation (Ruedi-Bettschen, Feldon et al. 2004). Periodic maternal separation may trigger malnutrition, heat stress and decreased somatosensory contact (Hofer 1994; Silva, Matos et al. 2011). One or more of these factors may be involved in different animal models of neonatal stress (Ruedi-Bettschen, Feldon et al. 2004). These models exhibit critical effects of maternal separation on the neuroendocrine response to stress in adulthood (Caldji, Diorio et al. 2000; Liu, Diorio et al. 2000), including greater vulnerability to depression, anxiety and eating disorders (Ladd, Huot et al. 2000; El Khoury, Gruber et al. 2006). However, these studies include numerous methodological variations, complicating the interpretation of late consequences of perinatal stress (Lehmann, Stohr et al. 2000; Simon, Pryce et al. 2005; Dsilna, Christensson et al. 2008). Maternal deprivation (DM, separation of mother and offspring and between pups) for five hours daily between the second and sixth day of lactation leads to an increase in plasma corticosterone levels in response to stress (Biagini, Pich et al. 1998), while four and a half hours of separation for three weeks produces the opposite effect (Ogawa, Mikuni et al. 1994). One study examined the expression of receptors for serotonin, a neurotransmitter important for the control of various behaviors including food behavior, with a reduction in receptor expression observed in the model of MS, but no effect in the DM model (Harro, Merenakk et al. 2009). The DM paradigm seems to have greater behavioral consequences than the MS model (Zimmerberg and Sageser 2011). Different conditions

of temperature and light during the DM influence its effects on feeding behavior in response to reward (Ruedi-Bettschen, Feldon et al. 2004).

Settings for the control of feeding behavior established in the neonatal period control the response to different demands in adulthood since HPA axis dysfunction is related to the pathogenesis of eating disorders (Koo-Loeb, Costello et al. 2000; Putignano, Dubini et al. 2001; Gluck, Geliebter et al. 2004). Maternal separation increases the basal levels of hypothalamic NPY (Husum and Mathe 2002), inhibiting increases in NPY in response to fasting (Kim, Lee et al. 2005). Animals that have suffered the stress of perinatal malnutrition show hyperphagia associated with increased levels of hypothalamic peptides that stimulate hunger (NPY) and reduced levels of those that inhibit hunger (POMC) (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009; Orozco-Solis, Matos et al. 2010), as well as changes in the serotonergic control of satiety (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al. 2008). Mice that were separated from their mothers are more vulnerable to developing anorexia nervosa (Hancock and Grant 2009). Experiences of childhood abuse are prevalent among patients with eating disorders (Wonderlich, Brewerton et al. 1997). Animals that experienced episodes of maternal separation during the neonatal period exhibited a preference for palatable foods associated with increased levels of corticosterone (Dallman, Akana et al. 2003; Silveira, Portella et al. 2004). In various mammalian species, mechanisms of the control of feeding behavior are influenced by the biological rhythm of the sleep-wake cycle (Denenberg 1999). Studies show that the maternal care of offspring is greater in the light cycle than in the dark, because the mother does not change her biological rhythms and thus expends more time feeding the pups during the light cycle. It is believed that animals separated from their mothers during the light cycle exhibit more severe long-

term consequences compared with those separated during the dark period (Ruedi-Bettschen, Feldon et al. 2004).

This paper demonstrates the importance of maternal care in the regulation of important aspects controlling feeding behavior. This work studies the hypothesis that maternal separation during the period of greatest contact between mother and offspring in rodents, which occurs during daylight, promotes more intense phenotypic adjustments in the regulation of energy balance. The objective of this study is to assess the feeding behaviors of animals separated from their mothers at different periods of the light and dark cycle, for example, by studying the Behavioral Satiety Sequence. This study also aims to investigate whether this separation affects circadian rhythms, ingestion, deprivation and feed preference among carbohydrates, protein and fat, as well as the effects of separation on adaptations in the response to starvation in rats.

2.0 Materials and Methods

2.1 Animals

Wistar albino rats were obtained from the colony of the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. The animals were kept under standard vivarium conditions with a constant temperature of 23 ° C (± 2), a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 6 a.m.) and free access to water and food (Labina Purina do Brasil ®). Animal handling and care followed the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethics Committee for animal experimentation of the Universidade Federal de Pernambuco (23076.022943/2008-71 Protocol). Several litters were randomized on PND1 to form eight litters of pups of both sexes for each mother. After weaning, the animals were kept in boxes with two animals

each (same sex), receiving the standard Labina® diet until adulthood when the different tests were performed to study the feeding behavior.

2.2 Experimental Groups

After the eight litters of pups were formed on PND1, groups were formed as follows: (1) half of each litter of pups were separated from their mothers for six hours each day over PNP1-14 (SM), while (2) the control half of each litter remained with their mothers throughout the lactation (C). SM pups were moved to group cages with similar origin and with the temperature controlled to 30-32°C and were kept in another room (Plotsky and Meaney 1993). After the period of separation, the mothers were removed from the box, and the pups were placed in the nest for subsequent return of the mothers. To verify the differences caused by the mother-pup separation during different periods of activity in rats, which is associated with different levels of presence of the mother in the nest, maternal separation was performed in two cycles of light forming separate groups. Thus, the SM occurred during the light cycle or the dark cycle. The animals were further subdivided by gender so that each litter consisted of four males and four females, forming the following groups: control dark female and male (CDF and CDM); control light female and male (CLF and CLM); maternal separation during the dark (SDF and SDM); and maternal separation during the light (SLF and SLM). The control pups were not removed from the boxes except for cleaning on PND7. After 14 days of life, the animals were kept with their mothers without any further manipulation until weaning.

2.3. Analysis of feeding behavior

The Behavioral Satiety Sequence (BSS) analysis was performed on the 150th days of life. The BSS analysis procedure was developed by Halford et al (1998) (Halford, Wanninayake et al. 1998). The animals were fasted for five hours before they were supplied with food of a known weight. The BSS was recorded over one hour by a film system coupled to a computer in a nearby room. The films were analyzed by a trained observer, who recorded the duration (seconds) of the behaviors described below.

a) Feeding: Feeding was registered when the rat was observed starting to intake food and terminated when the rat left the feeder. b) Grooming: Grooming occurred when the rat first licked its legs and moved its head and continued with the licking of the ventral region and the back and hind paws. c) Resting: The rat was observed in the rest position, with the body resting on the floor of the cage. Other measures recorded food intake (difference between the weight (g) of feed offered and rejected during the one hour record of the BSS) and feed rate (g / min).

2.4. Body weight, adrenal gland weight and food intake

The body weights of all animals were measured at 14, 30, 120 and 180 days. The weight of the left adrenal gland was obtained at 180 days of life after animal sacrifice and dissection of the gland. To analyze the food intake, the animals were separated into individual cages at 110 days of life. After seven days of adaptation, food intake (g) was calculated every 12 hours in accord with the light and dark cycle. This analysis was performed for five consecutive days, and the results were presented as the average intake for each animal in each cycle of brightness during daytime testing.

2.5. Feeding Preference for Macronutrients

This analysis was performed at 180 days of life. After seven days of adaptation to individual cages, each cage was given three containers containing glycidic, lipid or protein feed (Table 2). The acrylic containers were fixed in a rectangular base fixed to the floor of the cage and kept in the box during the adaptation of the animal without any food. This allowed for a daily change in the position of the different diets among the containers to avoid the spatial learning factor. The intake (g) of each diet was calculated as the difference between the amount provided and rejected daily for five consecutive days. The results represent the average intake for each animal diet over five days.

2.6. Biochemistry of blood

At 200 days of age, the animals were quickly decapitated for trunk blood collection. Blood was then centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes to obtain serum. The samples were tested for HDL-cholesterol, glucose, total protein, total cholesterol and triglycerides by enzymatic methods (LABTEST ®).

2.7. Statistical Analysis

The results of food consumption in each twelve-hour period of light/dark, macronutrient preference and behaviors during the behavioral sequence of satiety test were analyzed by a two-way ANOVA followed by a Bonferroni posttest. Food consumption and feeding rate in the behavioral sequence of satiety test, body weight and blood biochemical data were analyzed using a one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. The level of statistical significance was $P < 0.05$.

3.0 Results

3.1 Food intake in the dark and light periods.

In the evaluation of the maternal separation effect (in the light cycle) on food intake in the dark and light periods, the two-way ANOVA indicated a significant interaction between gender and cycle [$F(3,72)= 5.24$, $P=0.002$ Fig. 1A)]. An important difference was found in relation to gender and food intake in the light and dark periods [$F(3,72)= 34.68$, $P<0.0001$, two-way ANOVA). *Post hoc* analysis indicated that maternal separation during the light cycle significantly increases the food intake (Kcal/B.W.) of females compared with control females (CF= 8.2 ± 0.2 , $n=10$, v.s SLF= 9.9 ± 0.3 , $n=10$; Bonferroni posttests, $P<0.05$).

Comparing the caloric intake relative to body weight revealed higher intake by female controls compared to male controls, only in the dark period (CF= 23.3 ± 0.5 , $n=10$ vs. CM= 18.2 ± 0.7 , $n=10$, $P<0.001$, Bonferroni posttests, Fig. 1A).

However, when comparing females and male separated from their mothers during the light period using Bonferroni posttests, the food intake was higher for females during both the light (SLF= 9.9 ± 0.3 , $n=10$ v.s SLM= 6.0 ± 0.2 , $n=10$, $P<0.001$) and dark periods (SDF= 23 ± 0.7 , $n=10$ vs. SDM= 18.4 ± 0.8 , $n=10$, $P<0.001$, Fig. 1A). The results for animals that were separated from their mothers during the dark period of the light/dark cycle were different from those of rats separated during the light period. Lower calorie intake was observed during the light period for males separated during the dark period compared with control males (CM= 7.1 ± 0.3 , $n=10$ vs. SDM= 5.3 ± 0.1 , $n=10$, $P<0.05$), and no difference was observed for females. However, the food intake during the dark period of the cycle was reduced in females separated during the dark

compared to control females (CF= 23.3±0.5, n=10 v.s SDF= 20.5 ±0.5, n=10, P<0.001, Bonferroni posttests, Fig. 1B).

The two-way ANOVA revealed an effect of gender on food intake (Kcal/g B.W.) total [(F5,54= 19.16, P<0.001)]. *Post hoc* analysis revealed that males had lower food intake than females independently of maternal separation (CF= 31.5±0.7, n=10 vs. CM= 25.3±0.9, n=10, P<0.001; SDF= 32.8±0.9, n=10 vs. SLM= 24.4±1.0, n=10, P<0.001; SDF= 29.7±0.6, n=10 vs. SDM= 24.4±1, n=10, P<0.001, Bonferroni posttests, Fig. 1C).

3.2 Macronutrient preferences

The study of macronutrient preferences revealed a significant gender x nutrient interaction [(F3,84= 6.88, P<0.0001, Fig. 3)]. For control groups, post hoc analysis revealed that males had higher caloric intake from the protein diet than females (CF= 4.1±0.7, n=8 vs. CM= 7.0±0.5, n=8, P<0.05, Bonferroni posttests). However, the caloric intake from the carbohydrate diet (CF= 15.7±0.7, n=8 vs. CM= 11.1±0.5, n=8, P<0.01, Bonferroni posttests) and the lipid diet (CF= 17.7±0.9, n=8 vs. CM= 12.8.1±0.6, n=8, P<0.01, Bonferroni posttests) were significantly lower in males as compared to females (Fig. 3A).

SLM rats exhibited increased calorie intake from protein compared with control rats (CF= 4.1±0.7, n=8 vs. SLF= 7.1±0.5, n=8, P<0.05, Bonferroni posttests), decreased intake from lipids (CF= 17.7±0.9, n=8 vs SCF= 13±1.1, n=8, P<0.001, Bonferroni posttests) and no difference in carbohydrate intake (CF= 15.7±0.7, n=8 vs. SLF= 14.2±0.8, n=8, P>0.05, Bonferroni posttests) (Fig. 3A). There was no difference in macronutrient intake for males separated during the same light period (protein: CM=

7.0±0.5, n=8 vs. SCM= 4±0.8, n=8; carbohydrates: CM= 11.1±0.5, n=8 vs. SLM= 10.4±0.4, n=8; lipid: CM= 12.8±0.6, n=8 vs. SLM= 12.7±1.4, n=8) (Fig. 3A).

The macronutrient intake for rats that were maternally separated during the dark period was different than that for rats separated during the light period. The separated females had lower lipid intake (CF= 17.7±0.9, n=8 vs. SDF= 11.6 ±2.2, n=8, P<0.001, Bonferroni posttests) and no difference (P>0.05) in carbohydrate and protein intake as compared to control rats (protein: CF= 4.1±0.7, n=8 vs. SDF= 6.9±0.7, n=8; carbohydrate: CF= 15.7±0.7, n=8 vs. SDF= 14.6±1.7, n=8, Bonferroni posttests). There was no significant effect on macronutrient intake for males separated during the dark period compared to control males (protein: CM= 7.0±0.5, n=8 v.s SDM= 4.4±0.6, n=8; carbohydrate: CM= 11.1±0.5, n=8 vs. SDM= 12.4±0.6, n=8; lipids: CM= 12.8±0.6, n=8 vs. SDM= 13.5±1.5, n=8) (Fig. 3B).

When comparing the total calorie intake from the three nutrient sources, a one-way ANOVA revealed an effect of gender (F5, 42 = 7.29, P <0.0001, Figure 3C). Control and separated males had lower calorie intake compared to females (CF = 39.5 ± 1.5, n = 8 v.s CM = 30.9 ± 0.6, n = 8, P <0.01; SLF = 34.4 ± 1.9, n = 8 v.s SLM = 27.1 ± 1.8, n = 8, P <0.05, Bonferroni's multiple comparison test). No difference in caloric intake was observed between males and females separated during the dark period (CM = 33.1 ± 1.8, n = 8 v.s SDM = 30.4 ± 1.4, n = 8, P> 0.05, Figure 3C, Bonferroni's multiple comparison test).

3.3 Behavioral satiety sequence

A two-way ANOVA did not reveal significant effects of maternal separation in either period on feeding and grooming duration in the BSS test (Fig. 2A-F). The two-

way ANOVA revealed the effect of maternal separation [$F(3, 216)= 16.31, P<0.0001$] and the effect of light v.s dark periods on resting behavior [$F(3,216)=40.70, P<0.0001$] (Fig. 2A, B, D and E). When the animals were separated from their mothers during the light period, the rest period began sooner than that for the controls, between periods 7 and 8 ($P <0.001$) (Fig. 2D and E). The control males compared to females were different for the same periods (7, $P <0.01$; 8, $P <0.01$, Bonferroni's multiple comparison test) (Fig. 2A and D).

For resting behavior, the two-way ANOVA indicated a significant interaction of maternal separation during the dark cycle with periods [$F(3,252)=2.212, P=0.0037$]: maternal separation [$F(3,252)=5.702, P=0.0009$] and periods [$F(3,252)=61.96, P<0.0001$]. Maternal separation during the dark cycle was associated with resting behavior during period 9 ($P<0.01$, Bonferroni's multiple comparison test) (Fig. 2A and C). There was no difference in resting behavior for females based on maternal separation.

The one-way ANOVA revealed an effect of maternal separation on food intake in the BSS test ($F_{3,28}= 44.24, P<0.0001$, Tab. 2). Maternal separation in either the light or dark period increased food intake in females compared to control females (CF = $8.4 \pm 0.2, n = 10$ vs. SLF = $9.9 \pm 0.3, n = 10, P <0.001$, SDF vs. CF = $10 \pm 0.4, n = 10, P <0.01$, Bonferroni's multiple comparison test, Tab. 2). There was no effect of maternal separation on food intake in males. A post hoc test revealed a decrease in food intake for males compared to females considering food intake relative to body weight (Tab. 2).

For the rate of food intake (Kcal/minute), a one-way ANOVA revealed an effect of gender ($F_{3,28} = 11.4, P<0.0001$, Tab. 2). The rate of food intake was higher in

control females compared to control males (Tab. 2). Maternal separation had no effect on the rate of food intake (Tab. 2).

3.4 Body and adrenal weight and serum determinations

A one-way ANOVA revealed an effect of maternal separation during the light period on body weight at 180 days of life ($F_{3,36}=92.64$, $P<0.0001$). Males subjected to maternal separation had a higher body weight than control males ($CM=439.2\pm 21.3$, $n=10$ vs. $SLM=499.4\pm 61$, $n=10$, $P<0.01$, Bonferroni's multiple comparison test, Tab. 3). No difference was observed in the body weight of the maternal separation groups between the females and males (Tab. 3).

The one-way ANOVA revealed significant differences in the adrenal weight of rats separated during the light [$F=(3,36)=79.16$ $P<0.0001$] and dark cycles [$F=(3,36)=79.16$ $P<0.0001$]. A post hoc test revealed that females had a higher adrenal weight than males across all experimental groups (Tab. 3).

The one-way ANOVA revealed a significant effect of maternal separation in the dark period on serum biochemical tests ($F_{3,35}=6.39$, $P<0.05$). Females subjected to maternal separation exhibited a higher concentration of triglycerides in serum ($CF=59.2\pm 10.1$, $n=10$ v.s. $SDF=97.8\pm 10.7$, $n=10$, $P<0.001$, Bonferroni's multiple comparison test, Tab. 3). No differences in serum determinations in males (Tab. 3).

4.0 Discussion

The present study assessed the effects of a standard early maternal separation paradigm on the feeding behavior parameters in later life. Neonatal maternal separation is an animal model of a stressful experience in childhood. This study used the experience of repeated maternal separation during the first two weeks of life. However,

the dynamics of interaction between the mother and offspring differ depending on the circadian cycle condition (light or dark). Pups receive more maternal care during the light period because the dam spends the most time on the nest during this period (Ader 1970). During the dark phase, the dam spends most of her time on locomotor activity and feeding (Ader 1970).

This study examined the possible factors programming feeding behavior later in life. We observed differences in feeding behavior parameters between offspring subjected to maternal separation in different periods of the circadian cycle. The results indicate that characteristics of mother-pup interactions can imprint various effects on feeding behavior in later life. Neonatal rats exhibit higher food intake during the light cycle until they are near weaning, when they begin the nocturnal pattern of food intake (Hall and Rosenblatt 1978). We suggest that this characteristic should be considered in animal models of maternal separation. However, most studies separate the mother and offspring during the light cycle. This could lead to a reduction of tactile contact, but also of milk intake.

The maternal separation model was used here to consider the different effects of separation in the light and dark cycles. We characterized the food intake patterns starting from daily caloric intake. Because of the circadian rhythm of consumption in rodents (80% of eating takes place in the dark), we investigated the effect of maternal separation on food intake during the light and dark periods. To analyze the integrity of the mechanisms of satiety, we used the behavioral sequence of satiety test (Blundell and Halford 1994). Finally, we analyzed the distribution of nutrients consumed by rats and the effects of separation on these consumption patterns.

The results of this study showed that maternal separation during the light cycle increased body weight in later life only in males. Some studies found that maternally separated rats have a lower or normal body weight just after weaning and that they thereafter (three months) have the same or greater weight than the control rats (Tonjes, Hecht et al. 1986; Matthews, Wilkinson et al. 1996; Suchecki and Tufik 1997). When separated from their mothers for three hours, the pups showed no differences in body weight gain and food intake during the first two weeks of life (Plotsky and Meaney 1993). In general, the studies in the literature do not show consistent effects of maternal separation on body weight. These results are consistent with our findings for males that were subjected to maternal separation in the light cycle. One objective of this study was to evaluate the possible dissociation between factors involved in the maternal separation model in rodents. Separation from the mother during the light cycle leads to a decrease in both milk intake and tactile contact because mothers spend more time lactating the pups during the light cycle (Ader 1970). During the first 17 days of life, pups follow a diurnal pattern of food intake (Hall and Rosenblatt 1978). Although this deficit did not lead to a dramatic change in body weight during the lactation period, it may have been sufficient to modulate the body weight in later life, demonstrating that decreased food intake in early life can act as a programmer of overweight/obesity.

The 24-hour food intake in kilocalories relative to body weight was influenced not by maternal separation but by gender, with females eating more than males. However, when food intake was analyzed separately in light and dark cycles, effects of maternal separation were observed in males and females.

The pattern of higher food intake during the dark cycle was not altered in any experimental group. However, we found that maternal separation in different cycles

altered food intake during the light and dark periods. Maternal separation during the light period increased or reduced the food intake of females and males, respectively, during the light period, without altering intake in the dark. This result is consistent with that obtained in a study on rats submitted to early weaning, where food intake increased in the light period (dos Santos Oliveira, de Lima et al. 2011).

Although maternal separation altered food intake during the light and dark periods, these effects were not sufficient to modify daily food intake. However, these changes in food intake during the light phase can indicate that phenotypic adjustments in feeding rhythm during the light and dark periods can be influenced by maternal separation. In mammals, the circadian rhythm is generated by the pacemaker located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN) (Stephan and Zucker 1972). At the molecular level, this pacemaker is controlled by a feedback network of transcriptional/translational genes *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock* and *BMAL1* in the SCN and peripheral clocks (Bass and Takahashi 2010). This network interacts with peripheral cellular metabolic processes to produce an oscillation of 24 hours in practically all cellular functions. In neonatal rats, changes in the timing of maternal care, restricted feeding or periodic maternal deprivation were reported to alter the pup circadian rhythms of certain behaviors and *rPer1* and *rPer2* circadian expression in the suprachiasmatic nuclei (Takahashi and Deguchi 1983; Viswanathan 1999; Ohta, Honma et al. 2002). The periodic absence of the mothers in the nursing period reset the neonatal circadian clock and resulted in the phase-reversal of behavioral rhythms measured after weaning (Ohta, Honma et al. 2003). The phase reversal of *rPer1* and *rPer2* expression in the SCN of the deprived pups might result from stress-induced hormonal or neural signals in the PVN (Ohta, Honma et al. 2003). The aggressions that affect the perinatal period can permanently alter the circadian factors (Orozco-Solis, Matos et al. 2011). For

example, feeding with a low-protein diet during gestation and lactation induces a long-lasting disruption of the diurnal expression pattern of several genes involved in the regulation of food intake and energy metabolism (Orozco-Solis, Matos et al. 2010). Perinatal undernutrition abolished the circadian rhythm of CART and POMC expression in the hypothalamus (Orozco-Solis, Matos et al. 2010). One factor to be considered in perinatal stress is the absence of the oscillation of the clock gene in the suprachiasmatic nucleus and the role of the adrenal gland as a pacemaker (Torres-Farfan, Mendez et al. 2011).

When animals were submitted to maternal separation during the dark period of the light/dark cycle in this study, in addition to the same alterations observed for separation during the light period, there was also a reduction in the nocturnal food intake of females. Experiments in ovariectomized rats demonstrated that estrogen replacement decreases food intake, especially during the light period (Varma, Meguid et al. 1999). This finding suggests that the anorexic effect of estrogen may be specific for the light phase (Varma, Meguid et al. 1999). Estrogen receptors are expressed in the suprachiasmatic nucleus (Vida, Hrabovszky et al. 2008), and they can modify the excitability and neurotransmission of neurons (Fatehi and Fatehi-Hassanabad 2008). Estrogen replacement increases the neuronal activity of the SCN, especially during the light phase, reducing food intake (Takamata, Torii et al. 2011).

This study showed that maternal separation did not change the structure of satiety expression, but only modified the parameter and micro-structural constituents of this event, particularly the feeding rate. The feeding rate (kcal / min) was higher in females than in males. Studies have reported that the increase in food intake may be linked to increased levels of hypothalamic neuropeptide Y (NPY) promoted by maternal

separation (Jimenez-Vasquez, Mathe et al. 2001; Husum, Termeyer et al. 2002). This peptide is a potent orexigenic factor (Yokosuka, Kalra et al. 1999) that can be regulated by glucocorticoids (Ponsalle, Srivastava et al. 1992; Yokosuka, Kalra et al. 1999).

In the test of satiety, we observed effects of maternal separation on food intake after fasting. The increase in corticosterone levels associated with fasting may be required to increase the expression of hypothalamic NPY mRNA (Ponsalle, Srivastava et al. 1992; Makimura, Mizuno et al. 2003). Furthermore, fasting was not observed to have a significant influence on food intake in males. In a study that examined the expression of hypothalamic peptides in response to a 48 h starvation period in male rats subjected to maternal separation, no changes in corticosterone levels or NPY expression were observed in adult life (Kim, Lee et al. 2005). However, increased expression of the anorexigenic neuropeptide pro-opiomelanocortin (POMC) was observed (Kim, Lee et al. 2005). In this study, males had a shorter meal duration when subjected to maternal separation during the dark cycle. This characteristic is associated with the profile of advancement of satiety (Blundell and Halford 1994). This result can also be associated with the increased expression of the POMC peptide because this peptide reduces meal size.

The other model of neonatal manipulation, early weaning, has effects similar to those of maternal separation, with high anxiety and high levels of corticosterone secretion in response to stress (Kikusui, Nakamura et al. 2006). Rats subjected to early weaning later showed a smaller meal size and an acceleration of satiety in response to fasting in adult life (dos Santos Oliveira, de Lima et al. 2011). In another perinatal manipulation, the supply of a low protein diet during gestation and lactation induced a delay in satiety and increased meal duration (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009).

These studies indicate the potential effects of manipulations during the vulnerable developmental period on the control mechanisms of satiety.

The present study is the first to show a relationship between maternal separation in light or dark phases of the circadian cycle on macronutrient self-distribution in adult life. Most studies have instead evaluated the intake of palatable food or diets high in fat or carbohydrates (Gibson 2006; Maniam and Morris 2010).

This study showed that maternal separation induced changes in the selection of nutrients depending on gender. Protein intake increased in males and decreased in females, and only females reduced their lipid intake. Differences in the effects of perinatal manipulations between the sexes are well documented (Ward and Renz 1972; de Jongh, Geyer et al. 2005; Weinstock 2007; Darnaudery and Maccari 2008). A pioneering study showed that male rats chose a glucose solution while females preferred a saccharin solution (Valenstein, Kakolewski et al. 1967). Mice genetically manipulated to develop obesity and exposed to an obesogenic environment showed a reduction in food intake accompanied by high levels of leptin, a result not observed in females (Schroeder, Moran et al. 2010). The maternal separation induced behavior related to anorexia nervosa in adolescent females and not during adulthood, contrary to observations for male rats (Hancock and Grant 2009).

Maternal separation also promoted a preference for protein at the expense of fat in females. The influence of gonadal hormones on regulatory processes such as the control of food intake and body weight has been documented since the 1970s (Wade 1972; Wade 1975). In female rats, the main findings are that a gain in body weight occurs after the removal of the ovaries, and a substantial increase in food intake and meal size and a concomitant increase in body weight are observed compared to

gonadally intact females (Blaustein and Wade 1976). These effects are due to the reduction of circulating estrogen levels consequent to ovariectomy, and they can be prevented or reversed by appropriately timed treatment with estradiol (Wade 1972). The pre-ovulatory increase in plasma estradiol concentration is associated with a transient decrease in food intake during estrus in cycling rats (Kennedy and Mitra 1963; Brown-Grant, Exley et al. 1970; Drewett 1973; Blaustein and Wade 1976). During proestrus, just after the peak in estradiol secretion, food intake decreases relative to diestrous levels (Kennedy and Mitra 1963). This decrease in energy intake, along with a correlated increase in energy expenditure (Presl, Horsky et al. 1967), results in a net body weight decrease during proestrus (Kennedy and Mitra 1963).

Decreased maternal care increases plasma corticosterone and E2 levels, cell proliferation in ovarian follicles and the duration of the estrous cycle and differentially regulates the expression of ER-a and ER-b in the ovaries of the offspring during adulthood (Amorim, Damasceno et al. 2011). Several studies have indicated that estradiol leads to an enhanced responsiveness of the HPA axis to a stressor that may be due in part to the impairment of negative glucocorticoid feedback (Peiffer and Barden 1987; Burgess and Handa 1993; Carey, Deterd et al. 1995; Ferrini, Lima et al. 1995; Patchev, Hayashi et al. 1995). The strong expression of glucocorticoid receptors in the PVN, especially in the parvocellular subdivision (Morimoto, Morita et al. 1996), is thought to be mainly involved in the negative feedback of corticosterone on the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis (Weiser and Handa 2009). Interestingly, intracerebroventricular infusion of dexamethasone (a glucocorticoid receptor agonist) stimulates food intake and body weight gain (Zakrzewska, Cusin et al. 1999) while decreasing peripheral glucose uptake (Cusin, Rouru et al. 2001). In view of this

evidence, we suggest that the females in this study reduced their fat intake to maintain a normal body weight.

In summary, this study indicates possible phenotypic adjustments in feeding behavior promoted by maternal separation during the first two weeks of lactation. These adjustments differ depending on the period of the circadian rhythm (light or dark) in which the separation is performed. We observe that separation during the dark cycle leads to more severe adjustments, indicating a dissociation between the presence of the mother and milk intake as factors that induce adjustments in feeding behavior.

5.0 References

- Ader, R. (1970). "The effects of early experience on the adrenocortical response to different magnitudes of stimulation." *Physiol Behav* **5**(8): 837-839.
- Amorim, E. M., D. C. Damasceno, et al. (2011). "Short- and long-term reproductive effects of prenatal and lactational growth restriction caused by maternal diabetes in male rats." *Reprod Biol Endocrinol* **9**: 154.
- Bass, J. and J. S. Takahashi (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics." *Science* **330**(6009): 1349-1354.
- Biagini, G., E. M. Pich, et al. (1998). "Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field." *Int J Dev Neurosci* **16**(3-4): 187-197.
- Blaustein, J. D. and G. N. Wade (1976). "Ovarian influences on the meal patterns of female rats." *Physiol Behav* **17**(2): 201-208.
- Blundell, J. E. and J. C. Halford (1994). "Regulation of nutrient supply: the brain and appetite control." *Proc Nutr Soc* **53**(2): 407-418.
- Brown-Grant, K., D. Exley, et al. (1970). "Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat." *J Endocrinol* **48**(2): 295-296.
- Burgess, L. H. and R. J. Handa (1993). "Estrogen-induced alterations in the regulation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in the female rat anterior pituitary gland and brain." *Mol Cell Neurosci* **4**(2): 191-198.

- Caldji, C., J. Diorio, et al. (2000). "Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity." *Biol Psychiatry* **48**(12): 1164-1174.
- Carey, M. P., C. H. Deterd, et al. (1995). "The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat." *J Endocrinol* **144**(2): 311-321.
- Cusin, I., J. Rouru, et al. (2001). "Intracerebroventricular glucocorticoid infusion in normal rats: induction of parasympathetic-mediated obesity and insulin resistance." *Obes Res* **9**(7): 401-406.
- Dallman, M. F., S. F. Akana, et al. (2003). "A spoonful of sugar: feedback signals of energy stores and corticosterone regulate responses to chronic stress." *Physiol Behav* **79**(1): 3-12.
- Darnaudery, M. and S. Maccari (2008). "Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress." *Brain Res Rev* **57**(2): 571-585.
- de Jongh, R., M. A. Geyer, et al. (2005). "The effects of sex and neonatal maternal separation on fear-potentiated and light-enhanced startle." *Behav Brain Res* **161**(2): 190-196.
- Denenberg, V. H. (1999). "Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy?" *Dev Psychobiol* **34**(1): 1-3.
- dos Santos Oliveira, L., D. P. de Lima, et al. (2011). "Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood." *Behav Processes* **86**(1): 75-80.
- Drewett, R. F. (1973). "Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat." *Anim Behav* **21**(4): 772-780.
- Dsilna, A., K. Christensson, et al. (2008). "Behavioral stress is affected by the mode of tube feeding in very low birth weight infants." *Clin J Pain* **24**(5): 447-455.
- El Khoury, A., S. H. Gruber, et al. (2006). "Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**(3): 535-540.
- Fatehi, M. and Z. Fatehi-Hassanabad (2008). "Effects of 17beta-estradiol on neuronal cell excitability and neurotransmission in the suprachiasmatic nucleus of rat." *Neuropsychopharmacology* **33**(6): 1354-1364.
- Ferrini, M., A. Lima, et al. (1995). "Estradiol abolishes autologous down regulation of glucocorticoid receptors in brain." *Life Sci* **57**(26): 2403-2412.
- Gibson, E. L. (2006). "Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways." *Physiol Behav* **89**(1): 53-61.
- Gluck, M. E., A. Geliebter, et al. (2004). "Cortisol stress response is positively correlated with central obesity in obese women with binge eating disorder

- (BED) before and after cognitive-behavioral treatment." *Ann N Y Acad Sci* **1032**: 202-207.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." *Pharmacol Biochem Behav* **61**(2): 159-168.
- Hall, W. G. and J. S. Rosenblatt (1978). "Development of nutritional control of food intake in suckling rat pups." *Behav Biol* **24**(4): 413-427.
- Hancock, S. and V. Grant (2009). "Early maternal separation increases symptoms of activity-based anorexia in male and female rats." *J Exp Psychol Anim Behav Process* **35**(3): 394-406.
- Harro, J., L. Merenakk, et al. (2009). "Personality and the serotonin transporter gene: Associations in a longitudinal population-based study." *Biol Psychol* **81**(1): 9-13.
- Hofer, M. A. (1994). "Early relationships as regulators of infant physiology and behavior." *Acta Paediatr Suppl* **397**: 9-18.
- Husum, H. and A. A. Mathe (2002). "Early life stress changes concentrations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in adult rat brain. Lithium treatment modifies these changes." *Neuropsychopharmacology* **27**(5): 756-764.
- Husum, H., E. Termeer, et al. (2002). "Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats." *Neuropharmacology* **42**(6): 798-806.
- Jimenez-Vasquez, P. A., A. A. Mathe, et al. (2001). "Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats." *Brain Res Dev Brain Res* **131**(1-2): 149-152.
- Kennedy, G. C. and J. Mitra (1963). "Spontaneous pseudopregnancy and obesity in the rat." *J Physiol* **166**: 419-424.
- Kikusui, T., K. Nakamura, et al. (2006). "Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice." *Behav Brain Res* **175**(1): 96-103.
- Kim, H. J., J. H. Lee, et al. (2005). "Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation." *Neuropeptides* **39**(6): 587-594.
- Koo-Loeb, J. H., N. Costello, et al. (2000). "Women with eating disorder tendencies display altered cardiovascular, neuroendocrine, and psychosocial profiles." *Psychosom Med* **62**(4): 539-548.
- Ladd, C. O., R. L. Huot, et al. (2000). "Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience." *Prog Brain Res* **122**: 81-103.

- Lehmann, J., T. Stohr, et al. (2000). "Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes." *Behav Brain Res* **107**(1-2): 133-144.
- Liu, D., J. Diorio, et al. (2000). "Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats." *Nat Neurosci* **3**(8): 799-806.
- Lopes de Souza, S., R. Orozco-Solis, et al. (2008). "Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake." *Eur J Neurosci* **27**(6): 1400-1408.
- Makimura, H., T. M. Mizuno, et al. (2003). "Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression." *BMC Physiol* **3**: 5.
- Maniam, J. and M. J. Morris (2010). "Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet." *Behav Brain Res* **208**(1): 72-79.
- Matthews, K., L. S. Wilkinson, et al. (1996). "Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood." *Physiol Behav* **59**(1): 99-107.
- Morimoto, M., N. Morita, et al. (1996). "Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study." *Neurosci Res* **26**(3): 235-269.
- Ogawa, T., M. Mikuni, et al. (1994). "Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors." *Pharmacol Biochem Behav* **49**(4): 961-967.
- Ohta, H., S. Honma, et al. (2002). "Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage." *Eur J Neurosci* **15**(12): 1953-1960.
- Ohta, H., S. Honma, et al. (2003). "Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups." *Eur J Neurosci* **17**(8): 1628-1634.
- Orozco-Solis, R., S. Lopes de Souza, et al. (2009). "Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding." *Physiol Behav* **96**(3): 481-492.
- Orozco-Solis, R., R. J. Matos, et al. (2010). "Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus." *PLoS One* **5**(10): e13537.
- Orozco-Solis, R., R. J. Matos, et al. (2011). "Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* **35**(7): 990-1000.

- Patchev, V. K., S. Hayashi, et al. (1995). "Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation." *FASEB J* **9**(5): 419-423.
- Peiffer, A. and N. Barden (1987). "Estrogen-induced decrease of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid concentration in rat anterior pituitary gland." *Mol Endocrinol* **1**(6): 435-440.
- Plotsky, P. M. and M. J. Meaney (1993). "Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats." *Brain Res Mol Brain Res* **18**(3): 195-200.
- Ponsalle, P., L. S. Srivastava, et al. (1992). "Glucocorticoids are Required for Food Deprivation-Induced Increases in Hypothalamic Neuropeptide Y Expression." *J Neuroendocrinol* **4**(5): 585-591.
- Presl, J., J. Horsky, et al. (1967). "Fluorimetric estimation of oestrogen in the blood of infant female rats." *J Endocrinol* **38**(2): 201-202.
- Putignano, P., A. Dubini, et al. (2001). "Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol." *Eur J Endocrinol* **145**(2): 165-171.
- Ruedi-Bettschen, D., J. Feldon, et al. (2004). "Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects?" *Dev Psychobiol* **45**(2): 59-71.
- Schroeder, M., T. H. Moran, et al. (2010). "Attenuation of obesity by early-life food restriction in genetically hyperphagic male OLETF rats: peripheral mechanisms." *Horm Behav* **57**(4-5): 455-462.
- Silva, L. F., C. M. Matos, et al. (2011). "Handgrip strength as a simple indicator of possible malnutrition and inflammation in men and women on maintenance hemodialysis." *J Ren Nutr* **21**(3): 235-245.
- Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2004). "Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats." *Physiol Behav* **80**(5): 739-745.
- Simon, C. E., J. G. Pryce, et al. (2005). "Secondary traumatic stress and oncology social work: protecting compassion from fatigue and compromising the worker's worldview." *J Psychosoc Oncol* **23**(4): 1-14.
- Stephan, F. K. and I. Zucker (1972). "Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(6): 1583-1586.
- Suchecki, D. and S. Tufik (1997). "Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats." *Am J Physiol* **273**(4 Pt 2): R1332-1338.

- Takahashi, K. and T. Deguchi (1983). "Entrainment of the circadian rhythms of blinded infant rats by nursing mothers." *Physiol Behav* **31**(3): 373-378.
- Takamata, A., K. Torii, et al. (2011). "Chronic oestrogen replacement in ovariectomised rats attenuates food intake and augments c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus specifically during the light phase." *Br J Nutr* **106**(8): 1283-1289.
- Tonjes, R., K. Hecht, et al. (1986). "Behavioural changes in adult rats produced by early postnatal maternal deprivation and treatment with choline chloride." *Exp Clin Endocrinol* **88**(2): 151-157.
- Torres-Farfan, C., N. Mendez, et al. (2011). "A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal." *Endocrinology* **152**(5): 1891-1900.
- Valenstein, E. S., J. W. Kakolewski, et al. (1967). "Sex differences in taste preference for glucose and saccharin solutions." *Science* **156**(3777): 942-943.
- Varma, M., M. M. Meguid, et al. (1999). "Lack of influence of hysterectomy on meal size and meal number in Fischer-344 rats." *Physiol Behav* **66**(4): 559-565.
- Vida, B., E. Hrabovszky, et al. (2008). "Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones." *J Neuroendocrinol* **20**(11): 1270-1277.
- Viswanathan, N. (1999). "Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse (C57BL/6J)." *Physiol Behav* **68**(1-2): 157-162.
- Wade, G. N. (1972). "Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight." *Physiol Behav* **8**(3): 523-534.
- Wade, G. N. (1975). "Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats." *J Comp Physiol Psychol* **88**(1): 183-193.
- Ward, I. L. and F. J. Renz (1972). "Consequences of perinatal hormone manipulation on the adult sexual behavior of female rats." *J Comp Physiol Psychol* **78**(3): 349-355.
- Weinstock, M. (2007). "Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour." *Neurochem Res* **32**(10): 1730-1740.
- Weiser, M. J. and R. J. Handa (2009). "Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus." *Neuroscience* **159**(2): 883-895.
- Wonderlich, S. A., T. D. Brewerton, et al. (1997). "Relationship of childhood sexual abuse and eating disorders." *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **36**(8): 1107-1115.

- Yokosuka, M., P. S. Kalra, et al. (1999). "Inhibition of neuropeptide Y (NPY)-induced feeding and c-Fos response in magnocellular paraventricular nucleus by a NPY receptor antagonist: a site of NPY action." *Endocrinology* **140**(10): 4494-4500.
- Zakrzewska, K. E., I. Cusin, et al. (1999). "Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat." *Diabetes* **48**(2): 365-370.
- Zimmerberg, B. and K. A. Sageser (2011). "Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior." *Front Psychiatry* **2**: 39.

2^o Artigo

Título: Influências de parâmetros relacionados a interação mãe-filhote sobre o consumo alimentar hedônico.

Authors: Matilde Cesiana da Silva ^{a, *}, Raul Manhães de Castro ^c, Sandra Lopes de Souza ^b.

^aAcademic Center of Victoria University of Pernambuco, Vitoria de Santo Antao, Pernambuco, Brazil

^b Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

^c Nutrition Department - Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

*Mailing address: Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Rua Prof Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife, Pernambuco- Brazil
CEP:50670901Brazil.Fone:558121268555;Email:Sanlopesufpe@gmail.com

Resumo

O presente estudo analisou as repercussões da separação materna neonatal sobre comportamento alimentar na vida adulta. A partir do primeiro dia pós natal (DPN1), os ratos foram separados ou não de suas mães e dispostos nos seguintes grupos: Separação materna (SM), filhotes foram separados das mães do DPN1 ao DPN14, e Controle, filhotes permaneceram com as mães. A partir desta divisão foram formados os subgrupos: Controles machos e fêmeas claro e escuro (CF e CM); separação machos e fêmeas claro e escuro (SEF e SEM) e (SCF e SCM). No ciclo escuro, fêmeas e machos aumentaram os níveis de corticosterona (CM=112,70±7,00 v.s SEM=173,90±12,70, P<0,001; CF=74,6±8 v.s SEF=153,50±8,90, P<0,001). Quando os animais foram submetidos ao jejum foi observado que as fêmeas consumiram mais que os machos (CF= 15,41±0,43 v.s CM=14,44±0,32, n=10, P<0,001; SCF= 10,09±0,2 v.s SCM=7,20±0,30, n=10, P<0,001; SEF= 8,90±0,18 v.s SEM=6,90±0,30, n=10, P<0,001). A ingestão de calorias provenientes de dieta palatável foi maior em machos e fêmeas que foram separados no claro (CM= 12,1±0,46 v.s SCM=17,56±0,88, P<0,001; CF=14,31±0,35 v.s SCF= 19,39±0,68, P<0,001) ou no escuro (CM= 12,1±0,46 v.s SEM= 16,11±0,50, P<0,001; CF=14,31±0,35 v.s SEF=16,48±0,55, P<0,05). Sendo assim, foi possível observar que a separação materna, depender do ciclo de luminosidade em que ocorre, é capaz de alterar a expressão fenotípica do comportamento alimentar e a reatividade ao estresse em animais adultos.

1.0 Introdução

Durante o período perinatal, a interação do organismo com o ambiente direciona o desenvolvimento de sua estrutura e função em direção à melhor adaptação visando maior capacidade de sobrevivência e reprodução. Na experimentação animal, a separação periódica entre mãe e filhotes durante a lactação tem repercussões sobre a reatividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) ao estresse na vida adulta (Plotsky e Meaney, 1993; Yamazaki, Ohtsuki *et al.*, 2005). As características desta reatividade são diferentes dependendo da intensidade do estressor (suave ou severo) no modelo de separação materna (Macri, Laviola *et al.*, 2010). Assim, curtos períodos de separação (15 minutos diários durante as duas primeiras semanas de vida) reduzem respostas do eixo HPA a estressores na vida adulta, com redução na secreção de Fator Relacionado à Corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo e corticosterona (Plotsky e Meaney, 1993; Liu, Diorio *et al.*, 1997). Por outro lado, longos períodos de separação materna (3 a 6 horas diariamente durante as duas primeiras semanas de vida ou única separação de 24 horas durante a segunda semana de vida) estão associados a up-regulation do estresse com aumento na secreção de CRF e de corticosterona (Macri e Laviola, 2004; Ruedi-Bettschen, Feldon *et al.*, 2004).

Os cuidados maternos, como licking e grooming, parecem ser os agentes determinantes para as adaptações dos filhotes (Liu, Diorio *et al.*, 1997; Bagot, Van Hasselt *et al.*, 2009). A redução na reatividade ao estresse em ratos separados em curto período é observada em filhotes de mães com elevado nível de cuidado materno (Liu, Diorio *et al.*, 1997). A expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo é diretamente relacionada à frequência de licking e grooming materno. Esses receptores são importantes para o controle por feedback do eixo HPA em resposta ao estresse

(Adamec, Kent *et al.*, 1998). Assim, ninhadas que foram privadas de cuidado materno apresentaram redução no feedback negativo de glicocorticóides e um subsequente aumento da secreção de glicocorticóides em resposta ao estresse (Liu, Diorio *et al.*, 1997). Entre as conseqüências de distúrbios na interação mãe-filhote durante o período de lactação estão as alterações comportamentais permanentes na vida adulta, como aumento da vulnerabilidade a depressão e ansiedade (Ladd, Huot *et al.*, 2000; El Khoury, Gruber *et al.*, 2006), e distúrbios do comportamento alimentar (Gluck, Geliebter *et al.*, 2004).

As alterações da reatividade ao estresse provenientes do ambiente perinatal podem exercer papel na patogênese dos transtornos alimentares (Favaro, Tenconi *et al.*, 2006; Favaro, Caregaro *et al.*, 2009) já que a ação de glicocorticóides sobre peptídeos hipotalâmicos é capaz de modular o consumo alimentar (Dallman, Akana *et al.*, 1995). A separação materna gera aumento na expressão e liberação de neuropeptídeo Y pelo hipotálamo (Kalra, Dube *et al.*, 1991; Bi, Robinson *et al.*, 2003) e nos níveis basais de POMC mRNA no núcleo arqueado, bem como inibe a expressão de NPY mRNA induzida pelo jejum (um episódio de estresse). Estas alterações parecem estar associadas à atividade alterada do eixo HPA (Chung, Son *et al.*, 2005), que também exerce ação sobre o controle do balanço energético (para revisão ver Nieuwenhuizen e Rutters, 2008). A ritmicidade circadiana de expressão de outro peptídeo hipotalâmico, o AGRP mRNA, é regulada pela corticosterona (Lu, Shieh *et al.*, 2002). Em ratos manipulados (early life Handling) durante a lactação (modelo semelhante a estresse suave) observou-se preferência a alimentos palatáveis, quando ofertados em curtos períodos, sem modificação do consumo de alimento padrão (Silveira, Portella *et al.*, 2004; Silveira, Da Silva Benetti *et al.*, 2006). Esse padrão alimentar parece envolver ajustes na neurotransmissão serotoninérgica (Silveira, Portella *et al.*, 2010), bem como diminuição

do metabolismo dopaminérgico no núcleo accumbens (Silveira, Portella *et al.*, 2010). Já a separação materna de longa duração (6 horas por dia durante três semanas de lactação, challenge severo) promoveu consumo alimentar normal em condições padrões de alimentação, porém houve hiperfagia de rebote após tempo prolongado de restrição alimentar (Iwasaki, Inoue *et al.*, 2000).

O presente estudo, utilizando modelo de estresse neonatal de intensidade severa (separação diária de seis horas durante as duas primeiras semanas de lactação) teve como objetivo analisar possíveis adaptações fenotípicas do comportamento alimentar na vida adulta. Os efeitos da separação materna sobre níveis de ACTH, corticosterona e ingestão alimentar são revertidos quando há estimulação tátil dos filhotes (Van Oers, De Kloet *et al.*, 1998). Assim, considerando a importância dos cuidados maternos na definição de ajustes do eixo HPA, e conseqüente influência sobre a maturação e estabelecimento de padrões de controle do comportamento alimentar, foi realizada a separação materna em diferentes ciclos de luminosidade, claro ou escuro. Esses ciclos estão associados a maior ou menor permanência da mãe no ninho, o que pode ser determinante para expressão de fenótipos anormais.

2.0 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* (n=40) provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Após a verificação da prenhez as ratas foram mantidas individualmente em gaiolas de polipropileno, em condições padrões de biotério com temperatura de 20° (± 2), ciclo claro-escuro de 12-12h (com luzes acesas às 18h) e livre acesso à água e ração

(Labina/Purina Brasil). O manejo e os cuidados seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo 23076.022943/2008-71).

Para obtenção das ninhadas, os filhotes, de ambos os sexos, provenientes de várias mães foram randomizados no primeiro dia pós-natal (PND1), originando ninhadas de oito animais por gaiola. Os procedimentos de separação materna foram realizados no período de lactação. Após o desmame, no 25º dia pós-natal, foram acondicionados dois filhotes (mesmo sexo) em cada gaiola até a idade adulta quando foram realizados os diferentes testes para o estudo do comportamento alimentar.

2.2 Separação materna e formação dos grupos experimentais

Os grupos experimentais foram delineados de acordo com a incidência de estresse e com a fase do ciclo de luminosidade no qual foi feita a separação materna. Os animais machos e fêmeas que constituíram o grupo controle permaneceram com a mãe durante todo o período de lactação. Os animais do grupo estresse por separação, na proporção 4:4 por ninhada (quatro machos e quatro fêmeas) foram removidos do ninho durante seis horas por dia, diariamente, do DPN1 ao DPN14 e mantidos em incubadoras sob temperatura de 30-32°C, segundo o protocolo de Plotsky et al (1993) (Plotsky e Meaney, 1993). Essa separação foi realizada em duas fases dos ciclo de luminosidade: um grupo foi separado por seis horas no ciclo claro (18:00h-00:00h) e outro no ciclo escuro (06:00h-12:00h). Os grupos controle fêmea (CF), controle macho (CM), separação escuro fêmea (SEF), separação escuro macho (SEM), separação claro fêmea (SCF), separação claro macho (SCM) foram compostos por machos (n=10) e fêmeas (n=10). Após o 14º dia de vida, os animais permaneceram com suas mães em gaiolas

transparentes (dimensões: 45,5x40,0x21cm) sem nenhuma manipulação adicional até o desmame.

2.3 Determinação da concentração de corticosterona no plasma e peso do tecido adiposo.

Aos 180° dias, os ratos foram decaptados para rápida retirada de estruturas encefálicas, tecido adiposo retroperitoneal e sangue. As estruturas encefálicas foram acondicionadas em microtubos, congeladas em gelo seco, e armazenadas em deep freezer à temperatura de -83°C. O peso do tecido adiposo foi aferido em balança digital Marte® (sensibilidade de 0,01g). Após a eutanásia, o sangue foi centrifugado a 1000 rotações por minuto durante 15 minutos. O plasma foi coletado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

A concentração de corticosterona no plasma foi determinada por meio de ELISA (Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit, Assay Designs/Stressgen, Ann Arbor, MI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Este kit possui um anticorpo policlonal específico para a corticosterona de rato. Durante o ensaio, a corticosterona presente na amostra de plasma compete pela ligação a este anticorpo, com uma molécula de corticosterona conjugada à fosfatase alcalina. Após a reação colorimétrica obtida com a adição do substrato enzimático, as absorbâncias foram determinadas em leitor de micro-placas (ELISA TP-Reader NM, Thermoplate, São Paulo, Brasil) com filtro de 405 nm. As quantidades de corticosterona nas amostras mensuradas em duplicata foram calculadas a partir de curvas-padrão com quantidades conhecidas de corticosterona e os resultados apresentados como médias aritméticas \pm desvio padrão.

2.4 Evolução do peso corporal

O peso corporal (g) dos animais de todos os grupos foi aferido aos 14, 30, 120 e 180 dias de vida pós-natal em balança digital Marte® (sensibilidade de 0,01g).

2.5 Consumo alimentar antes e após estresse

Quando completaram as idades 120 e 150 dias de vida, os ratos dos grupos controle e separação materna foram alocados em gaiolas individuais para adaptação ao isolamento por dez dias. Logo após esse período, foram inseridos em suas gaiolas 30g de dieta palatável. Considerou-se a quota ingerida de alimento (g) através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada, no período de uma hora.

Para analisar a resposta ao estresse, um outro grupo de animais, após a adaptação ao isolamento, foi submetido ao estresse alimentar. Durante este período, diariamente, no horário das 12:00 às 13:00 h, foi introduzido um recipiente (dimensões: 24,0x 10,0 cm) contendo 30 g de dieta palatável para que houvesse adaptação ao alimento. No 11º dia de isolamento, os ratos foram submetidos à privação alimentar durante quatro horas, com livre acesso à água. Após este período de jejum, o estresse alimentar foi induzido através da introdução de dieta palatável em recipiente que não permitia a alimentação do animal. Dessa forma, o animal em jejum obteve apenas informações visuais e olfativas do alimento durante quinze minutos. Passados os quinze minutos de estresse, os animais tiveram acesso à dieta durante uma hora e, em seguida, foi aferida a ingestão alimentar. A ingestão alimentar (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada.

2.6 Privação alimentar

Após a adaptação, ratos foram submetidos à privação alimentar de oito horas. Após o período de privação, foram inseridos em suas gaiolas 30 g de dieta padrão de biotério

(Labina-Purina do Brasil/AS). O consumo alimentar foi quantificada após o período de uma hora. A quota ingerida (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada.

2.7 Ansiedade experimental

O teste para avaliação da ansiedade foi realizado nos animais com idades entre 120 e 150 dias, entre 12h00 e 14h00, foi utilizado o modelo do labirinto elevado em cruz (Silveira, Portella *et al.*, 2004). O labirinto elevado se constitui em dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) e se estende a partir de uma plataforma central comum (10x10cm) com piso e paredes escuros, elevado a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso e iluminado sob uma luz vermelha de baixa voltagem (15 w) acima da área central. Este modelo experimental é baseado no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados. A realização do teste consistiu em colocar os animais, individualmente, no espaço central do aparelho, com a cabeça voltada para o braço fechado e posterior filmagem durante 5 min. Os registros foram realizados por aquisição das imagens por câmera com sistema infravermelho e armazenados em computador. Apenas um avaliador, sem conhecimento dos grupos experimentais, observou os filmes e registrou em protocolo o tempo de permanência e o número de entradas em cada braço. O registro de cada entrada teve validade, a partir do momento que o animal encontrou-se com as 4 patas (2 anteriores e/ 2 posteriores) em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado através de um cronômetro digital. A proporção e a percentagem do total de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos foram utilizados como índice de ansiedade.

2.8 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM), com exceção das tabelas que foram expressas em média \pm erro padrão. Nas comparações dos diferentes grupos, empregou-se a ANOVA one way, adotando níveis de significância $p < 0,05$. Para análise pós-teste, utilizou-se o teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

3.0 RESULTADOS

3.1- Corticosterona e Tecido adiposo

Os resultados obtidos mostram que houve efeito da separação materna no período escuro do ciclo de luminosidade sobre os níveis de corticosterona plasmática [F (3,31)=19,74, $P < 0,0001$, one-way ANOVA]. Na análise *Post hoc* foi identificado aumento nos níveis de corticosterona para machos e fêmeas comparados aos seus controles (CM=112,70 \pm 7,00, n=8 v.s SEM=173,90 \pm 12,70, n=7, $P < 0,001$; CF=74,6 \pm 8, n=8 v.s SEF=153,50 \pm 8,90, n=9, $P < 0,001$, Figura 1B). Observou-se também que o efeito da separação materna no período claro do ciclo de luminosidade sobre os níveis de corticosterona plasmática foram alterados [F (3,27)=11,47, $P < 0,0001$, one-way ANOVA]. Na análise *Post hoc* foi identificado aumento nos níveis de corticosterona para fêmeas comparadas ao seu controle (CF=74,6 \pm 8, n=8 v.s SCF=142,7 \pm 12, n=8, $P < 0,001$, Figura 1A). Entretanto, não foi observada diferença entre os machos separados no período claro do ciclo (CM=112,7 \pm 7, n=8 v.s SCM=130,7 \pm 7, n=7, $P > 0,05$).

A?

B?

Figura 1. Efeito da separação materna sobre a concentração de corticosterona. Os ratos machos (M) ou fêmeas (F) foram separados de suas mães no período claro (SC) ou escuro (SE) do ciclo circadiano. Os animais controle (C) permaneceram com suas mães. Os níveis de corticosterona foram aferidos na vida adulta após estresse alimentar de vinte minutos. Os valores estão representados em média \pm EP * representa diferença comparado aos respectivos controles (One way ANOVA, $P < 0.001$).

Em relação ao percentual de tecido adiposo de fêmeas e machos, apresentou alteração após a separação materna no ciclo claro [F (3,36)= 18,12, $P < 0,05$, one-way ANOVA] ou escuro [F (3,36)= 6,88, $P = 0,0009$]. As fêmeas separadas de suas mães durante o período claro do ciclo circadiano apresentam maior percentual de tecido adiposo quando comparadas aos machos (CF = $7,20 \pm 0,40$, $n = 10$ v.s CM= $5,54 \pm 0,30$, $n = 10$, $P < 0,05$; SCF= $8,03 \pm 0,50$, $n = 10$ v.s SCM= $4,25 \pm 0,28$, $n = 10$, $P < 0,001$, Figura 2A). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre grupos de separação materna no claro com seus respectivos controles. Quando os filhotes foram separados de suas mães no período escuro do ciclo circadiano, observamos efeitos diferentes sobre o percentual de tecido daquele observado em animais que foram separados no período claro. Após a análise com o teste *Post hoc*, identificou-se maior percentual de tecido adiposo em machos separados no escuro quando comparado ao seu controle (CM= $5,54 \pm 0,30$ v.s SEM= $7,12 \pm 0,29$, $n = 10$, $P < 0,05$, Figura 2B). Com esse maior percentual de tecido adiposo observado em ratos machos a diferença entre os sexos não foi observada nessa manipulação (SEM vs SEF= $7,45 \pm 0,23$, $n = 10$, $P > 0,05$, Figura 2B).

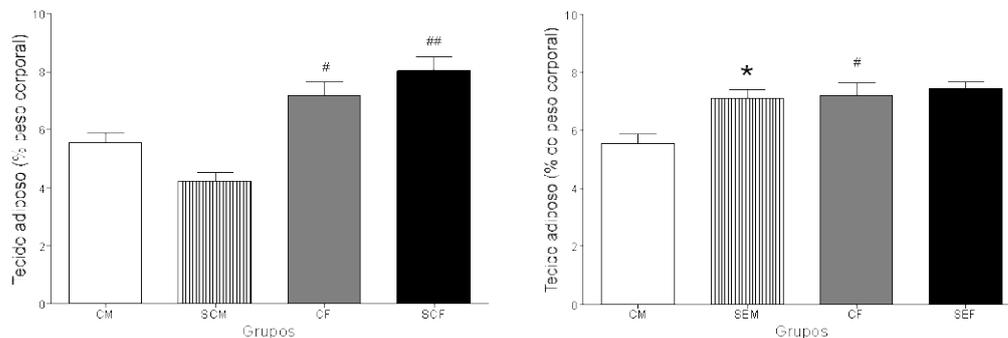


Figura 2. Efeito da separação materna sobre o peso do tecido adiposo abdominal relativo ao peso corporal. Os ratos machos (M) ou fêmeas (F) foram separados de suas mães no período claro (SC) ou escuro (SE) do ciclo circadiano. Os animais controle (C) permaneceram com suas mães. O tecido adiposo coletado foi aquele localizado na região retroperitoneal. Os valores estão representados em média \pm EP * diferença comparado aos respectivos controles, diferença entre gênero (One way ANOVA, $P < 0.001$).

3.2- Consumo de dieta palatável antes e após estresse

Quanto ao efeito da separação materna sobre o consumo de dieta palatável indicou alteração da separação materna no claro [$F(3,36) = 24,23$, $P = 0,0001$, one-way ANOVA] ou no escuro [$F(3,36) = 15,01$, $P = 0,0001$, one-way ANOVA]. A ingestão de calorias provenientes de dieta palatável foi maior em machos e fêmeas que foram separados no claro (CM= $12,1 \pm 0,46$ v.s SCM= $17,56 \pm 0,88$, $n = 10$, $P < 0,001$; CF= $14,31 \pm 0,35$ v.s SCF= $19,39 \pm 0,68$, $n = 10$, $P < 0,001$, Figura 3A) ou no escuro (CM= $12,1 \pm 0,46$ v.s SEM= $16,11 \pm 0,50$, $n = 10$, $P < 0,001$; CF= $14,31 \pm 0,35$ v.s SEF= $16,48 \pm 0,55$, $n = 10$, $P < 0,05$, Figura 3B).

Houve também alteração do consumo alimentar após estresse agudo em ratos separados de suas mães no ciclo claro [$F(3,36) = 6,78$, $p < 0,05$, one-way ANOVA] e ciclo escuro [$F(3,36) = 19,58$, $p < 0,05$, one-way ANOVA]. O teste *Post hoc* não identificou diferença entre os grupos separados no claro e seus controles (CF= $15,41 \pm 0,43$ v.s SCF= $17,71 \pm 0,69$, $n = 10$ e CM= $15,88 \pm 0,77$ v.s SCM= $15,8 \pm 0,74$, $n = 10$, Figura 3C). Quando separados no escuro, identificou menor consumo em fêmeas (CF= $15,41 \pm 0,43$ v.s SEF= $14,13 \pm 0,24$, $n = 10$, $P < 0,001$), mas não em machos (CM= $14,44 \pm 0,3$ v.s SEM= $13,46 \pm 0,49$, $n = 10$, Figura 3D), após a análise do teste *Post hoc*.

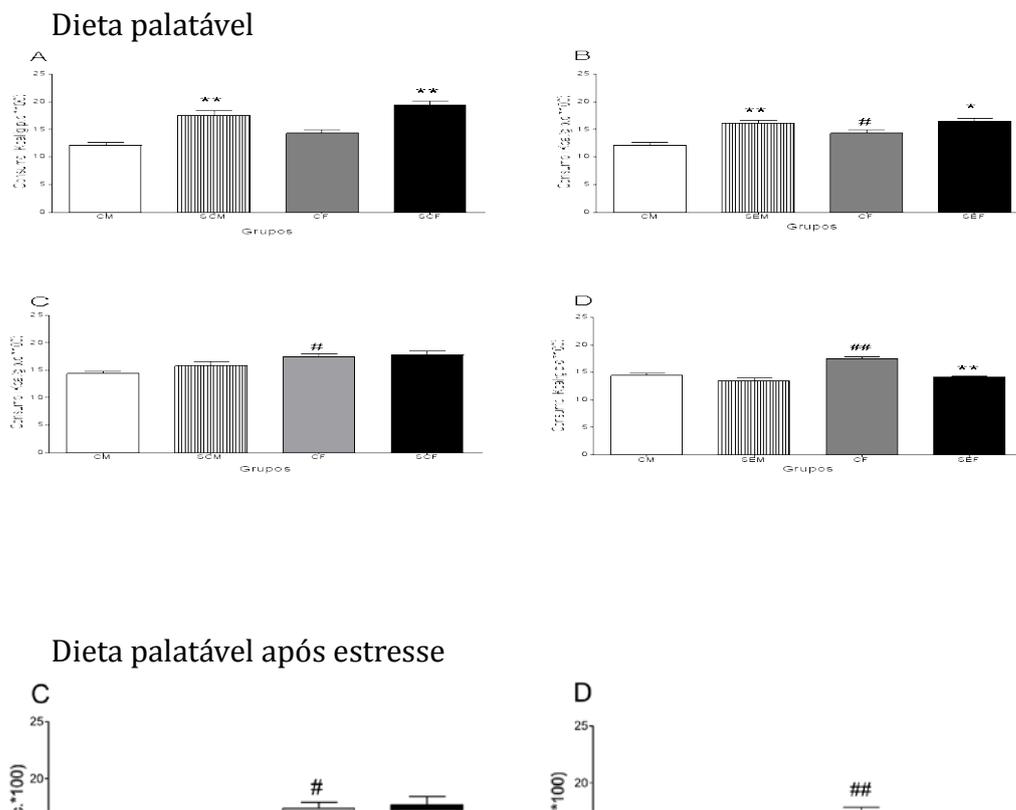


Figura 3 - Efeito do período de Separação Materna sobre o consumo alimentar de dieta palatável antes (A e B) e após estresse (C e D). Os animais foram separados das mães do 1º ao 14º dia de vida (n=10) no período claro (SCM e SCF) ou escuro (SEM e SEF) do ciclo circadiano, ou mantidos com suas mães (CM e CF). O consumo de dieta palatável foi realizado aos 120 dias de idade durante o período de uma hora. O estresse alimentar foi realizado durante 20 minutos. Os valores estão representados em média \pm EP. *diferença com o respectivo controle, # diferença de gênero.

2.3- Consumo alimentar em resposta a jejum

Quando observamos o consumo, os resultados mostram que houve efeito da separação materna no claro [F (3,36) = 22.00, P=0,0001, one-way ANOVA] ou escuro [F (3,36)=14,79, P=0,0001, one-way ANOVA] sobre o consumo alimentar em resposta a jejum. No entanto, após análise com o teste *Post hoc*, identificamos apenas maior consumo em fêmeas (CF= 15,41±0,43 v.s CM=14,44±0,32, n=10, P<0,001; SCF= 10,09±0,2 v.s SCM=7,20±0,30, n=10, P<0,001; SEF= 8,90±0,18 v.s SEM=6,90±0,30, n=10, P<0,001, Figura 4) quando comparado aos machos independente da separação materna. Para todas as análises foi utilizado o Post hoc Bonferroni's multiple comparasion test.

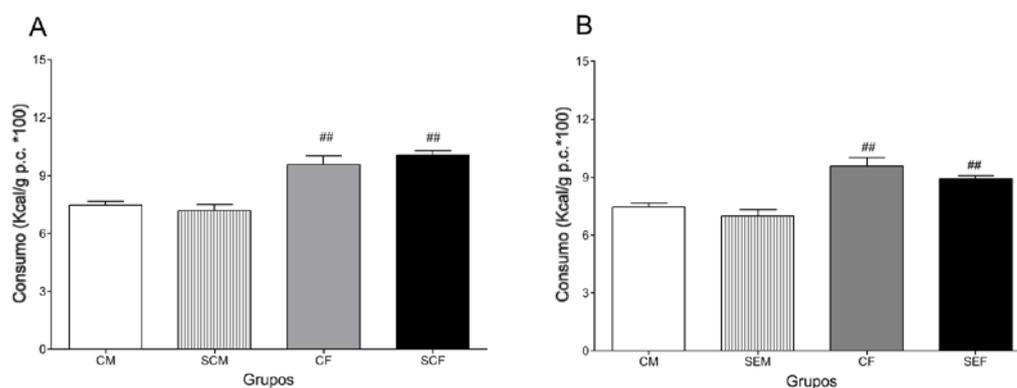


Figura 4- Efeito da separação materna sobre o consumo alimentar após jejum em ratos adultos. Os animais foram separados das mães do 1º ao 14º dia de vida (n=10) no período claro (SCM e SCF) ou escuro (SEM e SEF) do ciclo circadiano, ou mantidos com suas mães (CM e CF). O consumo foi obtido durante uma hora após oito horas de privação alimentar. Os valores estão representados em média ± EP. *diferença com o respectivo controle, # diferença de gênero.

2.4-Teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado

Através do teste do labirinto em cruz elevado, identificamos os níveis de ansiedade dos ratos quantificando o tempo (s) que o animal permanece no braço aberto, no braço fechado ou na região central do labirinto. Porém, não houve efeito da separação materna no período claro ou escuro do ciclo sobre o tempo gasto no centro do labirinto. Por outro lado, quando avaliamos o efeito da separação materna no ciclo claro (F

3,36=100,80, $P<0,0001$, one-way ANOVA) ou escuro ($F_{3,36}=4,49$, $P=0,0089$, one-way ANOVA) foi evidenciado efeito sobre o tempo de permanência no braço aberto. Ao realizarmos o teste *Post hoc*, observou-se menor tempo no braço aberto para machos (CM=54,60±1,80 vs SCM= 12,80±1,60, $n=10$, $P<0,001$, figura 5B) e fêmeas (CF=59,40±2,30 vs SCF=49,20±2,60, $n=10$, $P<0,01$, figura 5B) separados no ciclo claro quando comparados aos seus controles. Foi evidenciado também maior tempo no braço aberto para fêmeas separadas durante o período claro quando comparado aos machos separados no mesmo período (SCM versus SCF, $P<0,001$).

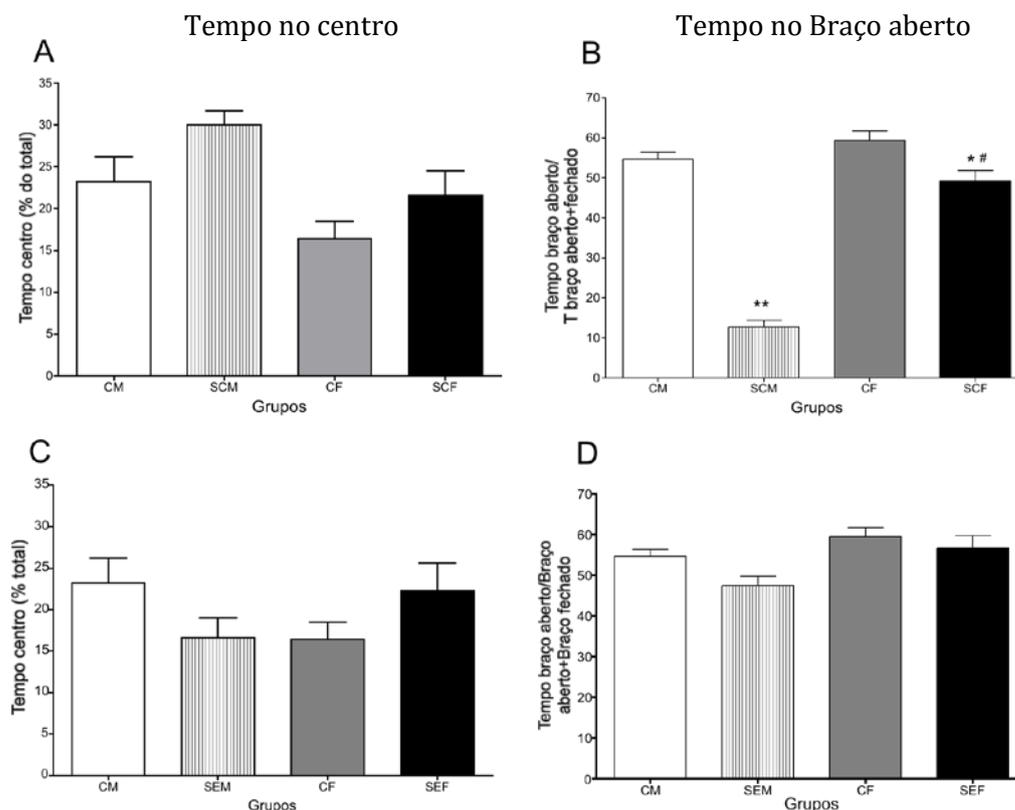


Figura 5. Efeito da separação materna sobre teste de ansiedade na vida adulta. Os ratos machos (M) ou fêmeas (F) foram separados de suas mães no período claro (Separação Claro - SC, A e B) ou escuro (Separação Escuro - SE, C e D) do ciclo circadiano. Os animais controle (C) permaneceram com suas mães. O teste foi realizado em cinco minutos contabilizando o tempo na região central (A e C) e no braço aberto (B e D). Os valores estão representados em média ± EP. *diferença comparado aos respectivos controles, # diferença entre gênero (One way ANOVA, $P<0,001$).

4. Discussão

A separação materna promoveu exacerbada resposta do eixo HPA ao estresse alimentar aumentando os níveis de corticosterona para machos e fêmeas. No entanto, o período do ciclo no qual os animais foram separados exerceu influência sobre a resposta de machos. Elevados níveis de corticosterona em resposta a estresse na vida adulta de organismos que sofreram separação materna é observado em vários estudos (Vallee, Mayo *et al.*, 1997; Rovirosa, Levine *et al.*, 2005; Ryu, Lee *et al.*, 2008). No entanto, essa característica parece depender do tempo de separação e da idade na qual ela ocorre. Assim, ratos que foram separados de suas mães nos dias 12, 14, 16 e 18 de vida por 6 horas não apresentaram modificações nos níveis de corticosterona em resposta a estresse na vida adulta (Lehmann, Russig *et al.*, 2002). Estresse materno durante a última semana de gestação em ratos, promoveu redução nos níveis de corticosterona ao nascimento (Lesage, Del-Favero *et al.*, 2004). Protocolo de separação materna com 180 minutos diários do 2 ao 14 dia de vida, promoveu aumento nos níveis de corticosterona basais (sem presença de estresse) (Oines, Murison *et al.*, 2012). No entanto, após serem submetidos a estresse social, não houve alteração dos níveis de corticosterona (Oines, Murison *et al.*, 2012). Experiência de separação materna repetida durante a lactação promove maior vulnerabilidade ao estresse, evidenciado por elevados níveis de corticosterona em resposta a um agente agressor (Levine, 2005). No presente estudo utilizamos um estressor moderado, diretamente relacionado ao comportamento alimentar para identificar a resposta do eixo HPA. Evidenciamos, com esse tipo de estressor, resultados semelhantes aos de outros estressores mais utilizados na literatura, como restrição alimentar (Stamp, Mashoodh *et al.*, 2008), isolamento de curto período (Gavrilovic, Spasojevic *et al.*, 2005), exposição a novo ambiente (Laviola, Adriani *et al.*, 2002)) entre outros. Os níveis de corticosterona em resposta a agentes estressores

em modelos de estresse neonatal parecem ser dependentes do tipo de estressor, idade no qual é avaliado, gênero e condições da separação (Biagini, Pich *et al.*, 1998; Ladd, Huot *et al.*, 2000; Ladd, Huot *et al.*, 2004). Assim, nós observamos que quando separados no período escuro do ciclo circadiano, ratos machos não apresentam modificações nos níveis de corticosterona após estresse alimentar, enquanto fêmeas, apresentam aumento independente do período do ciclo no qual foram separadas de suas mães. Em ratos submetidos a estresse neonatal, existe importância influência do gênero sobre a atividade do eixo HPA em longo prazo (Lehmann, Weizman *et al.*, 1999; Pryce e Feldon, 2003; Renard, Rivarola *et al.*, 2010). Em estudo com ratos submetidos a separação materna foi observado aumento na secreção de corticosterona em resposta ao estresse em fêmeas e nenhuma alteração em machos (Pryce e Feldon, 2003). Os efeitos diferenciados do estresse neonatal em machos e fêmeas, pode ocorrer devido as influencias dos hormônios gonadais sobre o desenvolvimento do sistema nervoso ou devido suas flutuações na vida adulta. Quanto as diferenças encontradas no presente estudo em relação ao período do ciclo circadiano no qual a separação foi realizada, podemos inferir que o fator nutricional é determinante para as repercussões desse modelo de estresse neonatal. A separação materna durante o período claro, pode promover influência do contato mãe-filho, mas sobretudo do consumo alimentar, pois roedores amamentam seus filhotes por maior tempo durante o período claro do ciclo. Modificações do ambiente nutricional durante o período perinatal, como por exemplo a desnutrição, tem influência sobre a responsividade do eixo HPA ao estresse (Lesage *et al.*, 2002). Assim, a eficiência do processo de feedback da corticosterona após estresse é aumentado em animais que foram desnutridos no período perinatal, o que resulta em níveis de corticosterona semelhante aos de animais controle (Lesage *et al.*, 2002).

No presente estudo, quando submetidos a teste com dieta rica em lipídios, ratos separados de suas mães consomem maior quantidade de calorias provenientes dessas dietas independente do período do ciclo no qual ocorreu a separação. O estresse parece influenciar o consumo alimentar a depender da relação entre a intensidade do estresse e a composição da dieta (Olivier *et al.*, 2000). Assim, o estresse agudo promove redução do consumo alimentar, porém, o estresse crônico ou moderado estimula o consumo de alimento palatável (Marti, Gavalda *et al.*, 1994; Matthews, Forbes *et al.*, 1995; Valles, Marti *et al.*, 2000). No entanto, esses estudos analisaram o consumo logo após estresse em ratos adultos. O estresse por separação materna pode, por mecanismos de plasticidade adaptativa, influenciar a preferência por alimento palatável na vida adulta atuando na maturação de mecanismos de controle do comportamento alimentar hedônico. Testes para resposta hedônica, demonstram aumento (Vazquez, Farley *et al.*, 2005), redução (Ladd, Huot *et al.*, 2000) ou nenhuma diferença (Matthews, Forbes *et al.*, 1995) no consumo de sacarose por ratos com histórico de separação materna. Essas diferenças ocorrem possivelmente devido as diferenças metodológicas empregadas em cada estudo. Como exemplo podemos citar a composição da ninhada em relação ao sexo dos filhotes. Ninhadas compostas com filhotes machos e fêmeas ou apenas com filhotes de um dos sexos parece ter influência nas repercussões da separação materna. Isso ocorre porque as mães dispensam maior cuidado com os filhotes machos comparado as fêmeas (Alleva, Caprioli *et al.*, 1989), o que promove efeito protetor para machos em relação aos ajustes fenotípicos da separação materna. Assim foi observado que ratos provenientes ninhadas compostas de machos e fêmeas apresentaram aumento no consumo de solução de sacarose na vida adulta devido a separação materna, o que não foi observado em ninhadas apenas de machos (Clifford, Holtzman, 2006).

A separação materna promove ajustes fenotípicos em sistemas de neurotransmissão envolvidos com o controle do comportamento hedônico, como o dopaminérgico mesolímbico (Weaver, Grant *et al.*, 2002). A separação materna aumenta a liberação de dopamina e reduz receptores D2 na área tegmentar ventral e diminui a densidade de transportador de dopamina no núcleo accumbens (Weaver, Grant *et al.*, 2002). Em conjunto essas alterações aumentam a neurotransmissão dopaminérgica. O maior consumo alimentar observado nesse estudo por animais separados de suas mães pode também estar relacionado ao maior nível de NPY. Os níveis de NPY (um potente estimulador da fome) no hipotálamo são aumentados em ratos com experiência de separação materna (Jimenez-Vasquez, Mathe *et al.*, 2001; Husum e Mathe, 2002). A expressão de NPY é influenciada por glicocorticoides, estabelecendo assim uma relação entre mecanismos estimulados pelo estresse e peptídeos hipotalâmicos que controlam o balanço energético (Makimura, Mizuno *et al.*, 2003).

Neste estudo, ratos que foram separados de suas mães na lactação apresentaram resposta a privação alimentar semelhante a animais não manipulados. A privação alimentar é um episódio de estresse que eleva os níveis plasmáticos de corticosterona em ratos (Makimura, Mizuno *et al.*, 2003; Kim, Lee *et al.*, 2005). Separação materna de três horas diárias durante as duas primeiras semanas de vida em ratos, promoveu inibição do aumento nos níveis de corticosterona e NPY no hipotálamo induzidos por privação alimentar (Kim, Lee *et al.*, 2005). No entanto, a separação materna altera as características do eixo HPA e sua resposta a eventos estressantes (Plotsky e Meaney, 1993; Liu, Caldji *et al.*, 2000).

No presente estudo, além da resposta a privação, analisamos o consumo de alimento palatável em resposta a vinte minutos de estresse alimentar. O acesso ao odor e a visão

do alimento palatável sem a possibilidade do seu consumo consiste em um estresse moderado baseado em uma quebra temporária no controle sobre as circunstâncias ambientais em ratos (Cifani, Polidori *et al.*, 2009). Esse modelo tem algumas vantagens em relação a outros tipos de estresse utilizados, evitando o desenvolvimento de medo ou freezing do animal, o que impede que ele engaje em seguida no consumo do alimento (Cifani, Polidori *et al.*, 2009). Outra vantagem desse tipo de estresse é que está baseado na relação do rato com o próprio alimento palatável, o que se aproxima do que ocorre em humanos.

Verificamos respostas semelhantes aquelas encontradas na privação alimentar, no entanto, houve uma influencia do período do ciclo no qual a separação foi realizada na resposta a esse tipo de estresse em fêmeas. Na maior parte dos testes de consumo alimentar, as fêmeas apresentam maior consumo de quilocalorias relativas ao seu peso corporal em relação aos machos. Esse resultado, permanece no consumo de dieta palatável em resposta ao estresse de privação alimentar, no entanto, é inexistente ou contrário quando o estresse foi alimentar. A separação materna no período escuro do ciclo, reduziu o consumo alimentar em resposta ao estresse para as fêmeas. A privação alimentar de 48 horas em fêmeas com histórico de separação materna (3 horas durante as duas primeiras semanas de vida), promoveu aumento na expressão de peptídeos anorexigênicos no hipotálamo, como a pró-opiomelanocortina e o CART além do orexigênico NPY, resultados não observados em machos (Yoo, Ryu *et al.*, 2011). A expressão basal desses neuropeptídeos em ratos submetidos a separação materna não foi alterada (Yoo, Ryu *et al.*, 2011). Estresse agudo promovido por nado, aumenta os níveis de corticosterona em fêmeas mas não em machos com histórico de separação materna. Os níveis de CRF foram maiores em fêmeas comparado aos machos. Isso pode justificar porque os autores encontraram inibição do aumento de NPY em resposta a privação

alimentar em machos (Kim, Lee *et al.*, 2005) mas não em fêmeas (Yoo, Ryu *et al.*, 2011). Outros estudos relatam que a separação materna por 180 minutos não influencia a expressão de NPY no hipotálamo em fêmeas (Slotten, Kalinichev *et al.*, 2006; Maniam e Morris, 2010).

Apenas em animais separados de suas mães no ciclo claro, observamos aumento do comportamento de ansiedade identificado pela redução no tempo de permanência no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Os efeitos foram mais intensos em machos comparado as fêmeas. Alguns estudos tem demonstrado que a separação materna pode levar ao desenvolvimento de ansiedade na vida adulta em ratos (Ladd, Huot *et al.*, 2000; Daniels, Pietersen *et al.*, 2004; Barbosa Neto, Tiba *et al.*, 2012). No entanto, o presente estudo identifica diferenças importantes em relação ao período do ciclo no qual foi realizada a separação sobre o comportamento de ansiedade. Animais separados no escuro não apresentaram modificações no comportamento de ansiedade. Como foi discutido para os resultados dos níveis de corticosterona, a separação materna no claro também pode envolver um fator de déficit nutricional. Recente estudo que analisou os efeitos da desnutrição proteica durante a gestação e/ou lactação, concluiu que ratos podem apresentar maior comportamento de ansiedade a depender do período no qual ocorre o déficit nutricional (Reyes-Castro, Rodriguez *et al.*, 2012). O déficit em apenas um micronutriente, como a vitamina E, foi capaz de induzir ansiedade em ratos (Terada, Okura *et al.*, 2011). Não observamos modificações no tempo gasto no centro do labirinto devido a separação materna. Quando o animal permanece longo período nessa região do labirinto é indicativo de dificuldade na tomada de decisão ou um conflito entre se aproximar ou evitar o estímulo aversivo, no caso, o braço (Rodgers e Johnson, 1995).

Evidenciamos que o estresse da separação materna induz ajustes fenotípicos direcionados ao maior consumo de alimento energético que pode ser bloqueado pelo estresse agudo na vida adulta. No estudo das repercussões do estresse por separação materna, vários fatores envolvidos na interação mãe-filhote durante o período de lactação podem influenciar em vias distintas o comportamento. Além disso, são distintos os efeitos a depender do gênero. O perfil de ansiedade, elevada responsividade do eixo HPA ao estresse, reduzido consumo alimentar em resposta a privação, elevado consumo de alimentos palatáveis, encontrados na maioria dos estudos descritos, podem ser devido não apenas a redução de contato materno, mas também a algum déficit nutricional associado. Isso ocorre porque os estudos em roedores realizam a separação entre mãe e filhotes durante o período claro do ciclo claro/escuro, no qual existe maior período de consumo alimentar dos filhotes.

5. Referências

- Ader, R. (1970). "The effects of early experience on the adrenocortical response to different magnitudes of stimulation." *Physiol Behav* **5**(8): 837-839.
- Amorim, E. M., D. C. Damasceno, et al. (2011). "Short- and long-term reproductive effects of prenatal and lactational growth restriction caused by maternal diabetes in male rats." *Reprod Biol Endocrinol* **9**: 154.
- Bass, J. and J. S. Takahashi (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics." *Science* **330**(6009): 1349-1354.
- Biagini, G., E. M. Pich, et al. (1998). "Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field." *Int J Dev Neurosci* **16**(3-4): 187-197.
- Blaustein, J. D. and G. N. Wade (1976). "Ovarian influences on the meal patterns of female rats." *Physiol Behav* **17**(2): 201-208.
- Blundell, J. E. and J. C. Halford (1994). "Regulation of nutrient supply: the brain and appetite control." *Proc Nutr Soc* **53**(2): 407-418.
- Brown-Grant, K., D. Exley, et al. (1970). "Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat." *J Endocrinol* **48**(2): 295-296.
- Burgess, L. H. and R. J. Handa (1993). "Estrogen-induced alterations in the regulation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in the female rat anterior pituitary gland and brain." *Mol Cell Neurosci* **4**(2): 191-198.

- Caldji, C., J. Diorio, et al. (2000). "Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity." *Biol Psychiatry* **48**(12): 1164-1174.
- Carey, M. P., C. H. Deterd, et al. (1995). "The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat." *J Endocrinol* **144**(2): 311-321.
- Cusin, I., J. Rouru, et al. (2001). "Intracerebroventricular glucocorticoid infusion in normal rats: induction of parasympathetic-mediated obesity and insulin resistance." *Obes Res* **9**(7): 401-406.
- Dallman, M. F., S. F. Akana, et al. (2003). "A spoonful of sugar: feedback signals of energy stores and corticosterone regulate responses to chronic stress." *Physiol Behav* **79**(1): 3-12.
- Darnaudery, M. and S. Maccari (2008). "Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress." *Brain Res Rev* **57**(2): 571-585.
- de Jongh, R., M. A. Geyer, et al. (2005). "The effects of sex and neonatal maternal separation on fear-potentiated and light-enhanced startle." *Behav Brain Res* **161**(2): 190-196.
- Denenberg, V. H. (1999). "Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy?" *Dev Psychobiol* **34**(1): 1-3.
- dos Santos Oliveira, L., D. P. de Lima, et al. (2011). "Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood." *Behav Processes* **86**(1): 75-80.
- Drewett, R. F. (1973). "Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat." *Anim Behav* **21**(4): 772-780.
- Dsilna, A., K. Christensson, et al. (2008). "Behavioral stress is affected by the mode of tube feeding in very low birth weight infants." *Clin J Pain* **24**(5): 447-455.
- El Khoury, A., S. H. Gruber, et al. (2006). "Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**(3): 535-540.
- Fatehi, M. and Z. Fatehi-Hassanabad (2008). "Effects of 17beta-estradiol on neuronal cell excitability and neurotransmission in the suprachiasmatic nucleus of rat." *Neuropsychopharmacology* **33**(6): 1354-1364.
- Ferrini, M., A. Lima, et al. (1995). "Estradiol abolishes autologous down regulation of glucocorticoid receptors in brain." *Life Sci* **57**(26): 2403-2412.
- Gibson, E. L. (2006). "Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways." *Physiol Behav* **89**(1): 53-61.
- Gluck, M. E., A. Geliebter, et al. (2004). "Cortisol stress response is positively correlated with central obesity in obese women with binge eating disorder (BED) before and after cognitive-behavioral treatment." *Ann N Y Acad Sci* **1032**: 202-207.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." *Pharmacol Biochem Behav* **61**(2): 159-168.
- Hall, W. G. and J. S. Rosenblatt (1978). "Development of nutritional control of food intake in suckling rat pups." *Behav Biol* **24**(4): 413-427.
- Hancock, S. and V. Grant (2009). "Early maternal separation increases symptoms of activity-based anorexia in male and female rats." *J Exp Psychol Anim Behav Process* **35**(3): 394-406.

- Harro, J., L. Merenakk, et al. (2009). "Personality and the serotonin transporter gene: Associations in a longitudinal population-based study." *Biol Psychol* **81**(1): 9-13.
- Hofer, M. A. (1994). "Early relationships as regulators of infant physiology and behavior." *Acta Paediatr Suppl* **397**: 9-18.
- Husum, H. and A. A. Mathe (2002). "Early life stress changes concentrations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in adult rat brain. Lithium treatment modifies these changes." *Neuropsychopharmacology* **27**(5): 756-764.
- Husum, H., E. Termeer, et al. (2002). "Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats." *Neuropharmacology* **42**(6): 798-806.
- Jimenez-Vasquez, P. A., A. A. Mathe, et al. (2001). "Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats." *Brain Res Dev Brain Res* **131**(1-2): 149-152.
- Kennedy, G. C. and J. Mitra (1963). "Spontaneous pseudopregnancy and obesity in the rat." *J Physiol* **166**: 419-424.
- Kikusui, T., K. Nakamura, et al. (2006). "Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice." *Behav Brain Res* **175**(1): 96-103.
- Kim, H. J., J. H. Lee, et al. (2005). "Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation." *Neuropeptides* **39**(6): 587-594.
- Koo-Loeb, J. H., N. Costello, et al. (2000). "Women with eating disorder tendencies display altered cardiovascular, neuroendocrine, and psychosocial profiles." *Psychosom Med* **62**(4): 539-548.
- Ladd, C. O., R. L. Huot, et al. (2000). "Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience." *Prog Brain Res* **122**: 81-103.
- Lehmann, J., T. Stohr, et al. (2000). "Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes." *Behav Brain Res* **107**(1-2): 133-144.
- Liu, D., J. Diorio, et al. (2000). "Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats." *Nat Neurosci* **3**(8): 799-806.
- Lopes de Souza, S., R. Orozco-Solis, et al. (2008). "Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake." *Eur J Neurosci* **27**(6): 1400-1408.
- Makimura, H., T. M. Mizuno, et al. (2003). "Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression." *BMC Physiol* **3**: 5.
- Maniam, J. and M. J. Morris (2010). "Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet." *Behav Brain Res* **208**(1): 72-79.
- Matthews, K., L. S. Wilkinson, et al. (1996). "Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood." *Physiol Behav* **59**(1): 99-107.
- Morimoto, M., N. Morita, et al. (1996). "Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study." *Neurosci Res* **26**(3): 235-269.
- Ogawa, T., M. Mikuni, et al. (1994). "Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors." *Pharmacol Biochem Behav* **49**(4): 961-967.

- Ohta, H., S. Honma, et al. (2002). "Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage." *Eur J Neurosci* 15(12): 1953-1960.
- Ohta, H., S. Honma, et al. (2003). "Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups." *Eur J Neurosci* 17(8): 1628-1634.
- Orozco-Solis, R., S. Lopes de Souza, et al. (2009). "Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding." *Physiol Behav* 96(3): 481-492.
- Orozco-Solis, R., R. J. Matos, et al. (2010). "Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus." *PLoS One* 5(10): e13537.
- Orozco-Solis, R., R. J. Matos, et al. (2011). "Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* 35(7): 990-1000.
- Patchev, V. K., S. Hayashi, et al. (1995). "Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation." *FASEB J* 9(5): 419-423.
- Peiffer, A. and N. Barden (1987). "Estrogen-induced decrease of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid concentration in rat anterior pituitary gland." *Mol Endocrinol* 1(6): 435-440.
- Plotsky, P. M. and M. J. Meaney (1993). "Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats." *Brain Res Mol Brain Res* 18(3): 195-200.
- Ponsalle, P., L. S. Srivastava, et al. (1992). "Glucocorticoids are Required for Food Deprivation-Induced Increases in Hypothalamic Neuropeptide Y Expression." *J Neuroendocrinol* 4(5): 585-591.
- Presl, J., J. Horsky, et al. (1967). "Fluorimetric estimation of oestrogen in the blood of infant female rats." *J Endocrinol* 38(2): 201-202.
- Putignano, P., A. Dubini, et al. (2001). "Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol." *Eur J Endocrinol* 145(2): 165-171.
- Ruedi-Bettschen, D., J. Feldon, et al. (2004). "Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects?" *Dev Psychobiol* 45(2): 59-71.
- Schroeder, M., T. H. Moran, et al. (2010). "Attenuation of obesity by early-life food restriction in genetically hyperphagic male OLETF rats: peripheral mechanisms." *Horm Behav* 57(4-5): 455-462.
- Silva, L. F., C. M. Matos, et al. (2011). "Handgrip strength as a simple indicator of possible malnutrition and inflammation in men and women on maintenance hemodialysis." *J Ren Nutr* 21(3): 235-245.
- Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2004). "Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats." *Physiol Behav* 80(5): 739-745.
- Simon, C. E., J. G. Pryce, et al. (2005). "Secondary traumatic stress and oncology social work: protecting compassion from fatigue and compromising the worker's worldview." *J Psychosoc Oncol* 23(4): 1-14.
- Stephan, F. K. and I. Zucker (1972). "Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(6): 1583-1586.

- Suchecki, D. and S. Tufik (1997). "Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats." *Am J Physiol* 273(4 Pt 2): R1332-1338.
- Takahashi, K. and T. Deguchi (1983). "Entrainment of the circadian rhythms of blinded infant rats by nursing mothers." *Physiol Behav* 31(3): 373-378.
- Takamata, A., K. Torii, et al. (2011). "Chronic oestrogen replacement in ovariectomised rats attenuates food intake and augments c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus specifically during the light phase." *Br J Nutr* 106(8): 1283-1289.
- Tonjes, R., K. Hecht, et al. (1986). "Behavioural changes in adult rats produced by early postnatal maternal deprivation and treatment with choline chloride." *Exp Clin Endocrinol* 88(2): 151-157.
- Torres-Farfan, C., N. Mendez, et al. (2011). "A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal." *Endocrinology* 152(5): 1891-1900.
- Valenstein, E. S., J. W. Kakolewski, et al. (1967). "Sex differences in taste preference for glucose and saccharin solutions." *Science* 156 (3777): 942-943.
- Varma, M., M. M. Meguid, et al. (1999). "Lack of influence of hysterectomy on meal size and meal number in Fischer-344 rats." *Physiol Behav* 66(4): 559-565.
- Vida, B., E. Hrabovszky, et al. (2008). "Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones." *J Neuroendocrinol* 20(11): 1270-1277.
- Viswanathan, N. (1999). "Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse (C57BL/6J)." *Physiol Behav* 68(1-2): 157-162.
- Wade, G. N. (1972). "Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight." *Physiol Behav* 8(3): 523-534.
- Wade, G. N. (1975). "Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats." *J Comp Physiol Psychol* 88(1): 183-193.
- Ward, I. L. and F. J. Renz (1972). "Consequences of perinatal hormone manipulation on the adult sexual behavior of female rats." *J Comp Physiol Psychol* 78(3): 349-355.
- Weinstock, M. (2007). "Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour." *Neurochem Res* 32(10): 1730-1740.
- Weiser, M. J. and R. J. Handa (2009). "Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus." *Neuroscience* 159(2): 883-895.
- Wonderlich, S. A., T. D. Brewerton, et al. (1997). "Relationship of childhood sexual abuse and eating disorders." *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36(8): 1107-1115.
- Yokosuka, M., P. S. Kalra, et al. (1999). "Inhibition of neuropeptide Y (NPY)-induced feeding and c-Fos response in magnocellular paraventricular nucleus by a NPY receptor antagonist: a site of NPY action." *Endocrinology* 140(10): 4494-4500.
- Zakrzewska, K. E., I. Cusin, et al. (1999). "Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat." *Diabetes* 48(2): 365-370.
- Zimmerberg, B. and K. A. Sageser (2011). "Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior." *Front Psychiatry* 2: 39.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A constatação de efeitos possivelmente prejudiciais provocados pela separação materna em estudos experimentais serve de base para as pesquisas epidemiológicas e clínicas e fortalecem alguns métodos, como o Mãe Canguru, que tem como principal objetivo manter neonatos nascidos com baixo peso ou prematuros em contato direto com suas mães de forma contínua. É evidente que o contato mãe-filho tem reduzido a morbimortalidade e favorecido o desenvolvimento somático de neonatos. Para a criança hospitalizada, a presença da mãe, traz benefícios como: redução no tempo de hospitalização, melhora no comportamento após a alta; declínio na incidência de infecções e de complicações pós-operatórias, aumento no senso de segurança e melhora significativa no sono

Apesar de alguns estudos utilizarem o modelo experimental da separação materna, as repercussões da separação sobre o comportamento alimentar ainda não haviam sido detalhadamente exploradas. Esse trabalho demonstrou que o estresse por separação materna em modelos experimentais promove efeitos diversos, de acordo com os ciclos de luminosidade, alterando padrões do comportamento alimentar e promovendo antecipação no disparo da saciedade. A depender do tipo de manipulação, há aumento da preferência por alimentos palatáveis com alta densidade calórica. Entretanto, as alterações hormonais e estruturais capazes de justificar tais alterações comportamentais ainda precisam ser exploradas.

REFERÊNCIAS

ADAMEC, R. et al. Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals--implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 2, p. 301-18, 1998.

ALLEVA, E.; CAPRIOLI, A.; LAVIOLA, G. Litter gender composition affects maternal behavior of the primiparous mouse dam (*Mus musculus*). **J Comp Psychol**, v. 103, n. 1, p. 83-7, Mar 1989.

BAGOT, R. C. et al. Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 3, p. 292-300, Oct 2009.

BARBOSA NETO, J. B. et al. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 518-26, Jan 2012.

BI, S.; ROBINSON, B. M.; MORAN, T. H. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 5, p. R1030-6, Nov 2003.

BIAGINI, G. et al. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. **Int J Dev Neurosci**, v. 16, n. 3-4, p. 187-97, Jun-Jul 1998.

CHUNG, S. et al. Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 3202-10, Jul 2005.

CIFANI, C. et al. A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine, fluoxetine, topiramate, and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 204, n. 1, p. 113-25, May 2009.

DALLMAN, M. F. et al. The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. **Ann N Y Acad Sci**, v. 771, p. 730-42, Dec 29 1995.

DANIELS, W. M. et al. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 1-2, p. 3-14, Jun 2004.

EL KHOURY, A. et al. Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 535-40, May 2006.

FAVARO, A. et al. Time trends in age at onset of anorexia nervosa and bulimia nervosa. **J Clin Psychiatry**, v. 70, n. 12, p. 1715-21, Dec 2009.

FAVARO, A.; TENCONI, E.; SANTONASTASO, P. Perinatal factors and the risk of developing anorexia nervosa and bulimia nervosa. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 1, p. 82-8, Jan 2006.

GAVRILOVIC, L.; SPASOJEVIC, N.; DRONJAK, S. Novel stressors affected catecholamine stores in socially isolated normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Auton Neurosci**, v. 122, n. 1-2, p. 38-44, Oct 30 2005.

GLUCK, M. E. et al. Cortisol, hunger, and desire to binge eat following a cold stress test in obese women with binge eating disorder. **Psychosom Med**, v. 66, n. 6, p. 876-81, Nov-Dec 2004.

HUSUM, H.; MATHE, A. A. Early life stress changes concentrations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in adult rat brain. Lithium treatment modifies these changes. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 5, p. 756-64, Nov 2002.

IWASAKI, S. et al. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. **Physiol Behav**, v. 70, n. 5, p. 551-6, Sep 15 2000.

JIMENEZ-VASQUEZ, P. A. et al. Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 131, n. 1-2, p. 149-52, Nov 26 2001.

KALRA, S. P. et al. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 23, p. 10931-5, Dec 1 1991.

KIM, H. J. et al. Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation. **Neuropeptides**, v. 39, n. 6, p. 587-94, Dec 2005.

LADD, C. O. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Prog Brain Res**, v. 122, p. 81-103, 2000.

LAVIOLA, G. et al. Peculiar response of adolescent mice to acute and chronic stress and to amphetamine: evidence of sex differences. **Behav Brain Res**, v. 130, n. 1-2, p. 117-25, Mar 10 2002.

LEHMANN, J. et al. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, n. 1, p. 141-5, Aug 2002.

LESAGE, J. et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. **J Endocrinol**, v. 181, n. 2, p. 291-6, May 2004.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 10, p. 939-46, Nov 2005.

LIU, D. et al. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **J Neuroendocrinol**, v. 12, n. 1, p. 5-12, Jan 2000.

LU, X. Y. et al. Diurnal rhythm of agouti-related protein and its relation to corticosterone and food intake. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 3905-15, Oct 2002.

MACRI, S.; LAVIOLA, G. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. **Behav Brain Res**, v. 154, n. 1, p. 231-8, Sep 23 2004.

MACRI, S. et al. Abnormal behavioral and neurotrophic development in the younger sibling receiving less maternal care in a communal nursing paradigm in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 392-402, Apr 2010.

MAKIMURA, H. et al. Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. **BMC Physiol**, v. 3, p. 5, Jul 9 2003.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 72-9, Mar 17 2010.

MARTI, O. et al. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 1, p. 1-7, Jul 1994.

MATTHEWS, K.; FORBES, N.; REID, I. C. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. **Physiol Behav**, v. 57, n. 2, p. 241-8, Feb 1995.

OINES, E. et al. Neonatal maternal separation in male rats increases intestinal permeability and affects behavior after chronic social stress. **Physiol Behav**, v. 105, n. 4, p. 1058-66, Feb 28 2012.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 18, n. 3, p. 195-200, May 1993.

PRYCE, C. R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 1-2, p. 57-71, Jan-Mar 2003.

RENARD, G. M.; RIVAROLA, M. A.; SUAREZ, M. M. Gender-dependent effects of early maternal separation and variable chronic stress on vasopressinergic activity and glucocorticoid receptor expression in adult rats. **Dev Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 71-80, Mar 2010.

REYES-CASTRO, L. A. et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. **Int J Dev Neurosci**, v. 30, n. 1, p. 39-45, Feb 2012.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 2, p. 297-303, Oct 1995.

ROVIROSA, M. J. et al. Circadian rhythm of corticosterone secretion in the neonatal rabbit. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 158, n. 1-2, p. 92-6, Aug 8 2005.

RUEDI-BETTSCHEM, D.; FELDON, J.; PRYCE, C. R. Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects? **Dev Psychobiol**, v. 45, n. 2, p. 59-71, Sep 2004.

RYU, V. et al. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 9, p. 1355-62, Sep 2008.

SILVEIRA, P. P. et al. Satiety assessment in neonatally handled rats. **Behav Brain Res**, v. 173, n. 2, p. 205-10, Oct 16 2006.

SLOTTEN, H. A. et al. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. **Brain Res**, v. 1097, n. 1, p. 123-32, Jun 30 2006.

STAMP, J. A. et al. Food restriction enhances peak corticosterone levels, cocaine-induced locomotor activity, and DeltaFosB expression in the nucleus accumbens of the rat. **Brain Res**, v. 1204, p. 94-101, Apr 14 2008.

TERADA, Y. et al. Dietary vitamin E deficiency increases anxiety-like behavior in juvenile and adult rats. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 75, n. 10, p. 1894-9, 2011.

VALLEE, M. et al. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 2626-36, Apr 1 1997.

VALLES, A. et al. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 3, p. R1138-44, Sep 2000.

VAN OERS, H. J. et al. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. **J Neurosci**, v. 18, n. 23, p. 10171-9, Dec 1 1998.

VAZQUEZ, V. et al. Maternal deprivation increases behavioural reactivity to stressful situations in adulthood: suppression by the CCK2 antagonist L365,260. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 181, n. 4, p. 706-13, Oct 2005.

WEAVER, I. C.; GRANT, R. J.; MEANEY, M. J. Maternal behavior regulates long-term hippocampal expression of BAX and apoptosis in the offspring. **J Neurochem**, v. 82, n. 4, p. 998-1002, Aug 2002.

YAMAZAKI, A. et al. Maternal deprivation in neonatal rats of different conditions affects growth rate, circadian clock, and stress responsiveness differentially. **Physiol Behav**, v. 86, n. 1-2, p. 136-44, Sep 15 2005.

YOO, S. B. et al. The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuropeptides**, v. 45, n. 5, p. 343-9, Oct 2011.

ANEXOS

Anexo A

105



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de dezembro de 2008

Ofício nº 91/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
 Para: **Prof.ª Sandra Lopes de Souza**
 Departamento de Anatomia - CCS
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23078. 022943 / 2008 - 71

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **“Desnutrição e estresse no período neonatal: Programação do padrão adulto do comportamento alimentar”**.

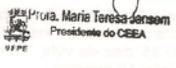
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente, 

Observação:
 Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;
 Animal; Rato; Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade:
 Adultos e do 1º ao 35º dias de vida; Número de animais
 previsto no protocolo: 48 animais.


 Profa. Maria Teresa Jansen
 Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

Anexo B

BEPROC-D-12-00121

Johan Bolhuis J.J.Bolhuis@uu.nl 4 jun

para mim

inglês

português

Traduzir mensagem

Desativar para: inglês

Ms. Ref. No.: BEPROC-D-12-00121

Title: Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats

Behavioural Processes

Dear Dr. Silva,

Your submission entitled "Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats" has been assigned the following manuscript number: BEPROC-D-12-00121.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/beproc/>.

Your username is: Matilde Silva

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/BEPROC/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Johan Bolhuis

Editorial Office

Behavioural Processes

Anexo C

[RN] Agradecimento pela Submissão

Maria Cristina Matoso suporte.aplicacao@scielo.org^{23 fev}
para mim

Silva,MC Matilde cesiana Cesiana da Silva,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Estresse Perinatal: suas características e repercussões sobre o comportamento alimentar na vida adulta." para Revista de Nutrição. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/rn/author/submission/82809>

Login: matildesilva

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.