

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA:
PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM
RATOS

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA:
PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM
RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado no Curso de Graduação em
Nutrição como requisito para conclusão do
Curso de Bacharel em Nutrição

Aluno: ELANA MARIA SIMÕES AMORIM
Orientador: MATILDE CESIANA DA SILVA

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

[reservado para ficha catalográfica]

[reservado para folha de aprovação]

Agradecimentos

A Matilde, minha orientadora, por seu apoio incondicional mesmo na fase mais difícil da minha vida. Meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Em ratos o estresse por separação materna causa, na vida adulta, o aumento da ingestão calórica e da ansiedade, comportamento de limpeza exarcebado e secreção de dopamina. O aumento no consumo alimentar parece estar relacionado a alimentos palatáveis. O principal objetivo deste trabalho foi investigar, em ratos, os efeitos da separação materna periódica na lactação sobre parâmetros do controle do comportamento alimentar na vida adulta. O modelo de estresse neonatal utilizado foi o de separação materna. Cada ninhada foi dividida em dois grupos, correspondentes ao grupo estresse e controle. Animais do grupo estresse foram submetidos a separação periódica de suas mães do primeiro ao décimo quarto dias de vida. O estresse alimentar consistiu da presença de alimento palatável na gaiola mas sem acesso pelo animal. Após quinze minutos de estresse os animais tiveram acesso à dieta e foram realizadas as análises do comportamento alimentar. Para a avaliação da seqüência comportamental de saciedade, os animais dos grupos controle e estresse foram mantidos previamente em privação alimentar de quatro horas pela retirada da ração de suas gaiolas. Após este período, o alimento com peso conhecido foi ofertado dando início ao registro comportamental. Os ratos que sofreram separação materna apresentaram redução da ingestão de dieta padrão em resposta a privação comparados aos grupos controles. Resultados contrários foram observados em relação a ingestão de dieta palatável. Em relação a seqüência comportamental de saciedade grupo controle apresentou maior tempo de alimentação e menor descanso quando comparado ao estresse. A duração do comportamento de limpeza foi maior no grupo estresse em relação ao controle. O estresse por separação materna, durante o período de lactação, altera o comportamento alimentar após desmame, particularmente quanto ao aparecimento da saciedade aumentando a ingestão de dietas palatáveis independente do gênero.

Palavras chave: Programação. Consumo Alimentar. Estresse Neonatal. Separação materna. Modelos animais.

Abstract

Stress in rats by maternal separation causes in adulthood, increased caloric intake and anxiety, exacerbated grooming behavior and the secretion of dopamine. The increase in food consumption seems to be related to palatable foods. The main objective of this study was to investigate in rats the effects of periodic maternal separation on lactation parameters on the control of feeding behavior in adulthood. The stress model was used neonatal maternal separation. Each litter was divided into two groups corresponding to the stress and control group. Stress group animals were subjected to periodic separation from their mothers and brothers from first to fourteenth days of life. Stress food consisted of the presence of palatable food in the cage without access by the animal. After fifteen minutes of stress animals had access to diet and analysis were accomplished in feeding behavior. For the assessment of behavioral sequence of satiety, the animals of control and stress groups were kept in previously fasted for four hours by the withdrawal of food from their cages. After this period, the food with known weight was given to begin its behavioral record. The rats that had experienced maternal separation reduced intake of dietary pattern in response to deprivation compared to control groups. Contrary results were observed for intake of palatable diet. Regarding the behavioral sequence of satiety control group spent more time feeding and less stress when compared to the rest. The duration of grooming behavior was higher in the stress compared to control. The stress of maternal separation during the period of lactation, feeding behavior changes after weaning, particularly the onset of satiety by increasing the intake of palatable diets regardless of gender.

Keywords: Programming. Feeding behavior. Stress. Maternal separation. Animal models.

Sumário

Introdução 9

Hipóteses..... 13

Objetivos 14

Materiais e Métodos..... 15

Resultados..... 18

Discussões 20

Conclusões 22

Referências 23

Introdução

Eventos ocorridos no início da vida podem afetar profundamente o desenvolvimento da fisiologia do organismo e o comportamento. Sendo a capacidade de adaptação do organismo ao seu ambiente de vital importância (McEwen, 1999).

Assim, para sobreviver em um ambiente adverso, o organismo sofre uma adaptação predizendo a permanência dessas condições no futuro (Gluckman e Hanson, 2004). Esse fato originou diversas teorias, entre as quais estão:

- A hipótese do “fenótipo protetor” (Hales e Baker, 1992) postula que uma agressão ambiental, como por exemplo, o estresse, ocorrido durante um período crítico do crescimento e desenvolvimento, poderia induzir mecanismos adaptativos objetivando maximizar o armazenamento e o uso de energia, beneficiando o indivíduo caso a condição permanecesse. Na ocorrência de um ambiente mais apropriado, essas adaptações tornariam tais indivíduos especialmente susceptíveis ao desenvolvimento de desordens metabólicas na vida adulta;
- A hipótese da “Resposta Adaptativa Preditiva” postula que um organismo ajusta sua fisiologia na vida perinatal predizendo que as mesmas condições permaneceriam após o nascimento, porém quando existe uma incompatibilidade entre a predição e o ambiente atual, há um risco aumentado de desenvolvimento de doenças (Gluckman e Hanson, 2004; Armitage et.al, 2005).
- A hipótese epigenética mostra que estudos têm identificado aumento na metilação do DNA e mudanças covalentes de histonas, com conseqüente modificações na expressão fenotípica (Waterland & Jirtle, 2004).

A relação entre desordens metabólicas na vida adulta e os fatores ambientais que ocorrem no início do desenvolvimento foi denominado “Programação” através de estudo experimental feito por Lucas (1991). A primeira evidência de programação veio através de um estudo epidemiológico realizado por Barker em (1986) onde foi vista a ligação entre a alta taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares e o baixo peso ao nascer. Hoje sabemos que a desnutrição ou supernutrição perinatal

estão associadas a síndrome metabólica na vida adulta nos níveis molecular, celular e comportamental (Barker e Osmond, 1986; Reaven, 1988; Desai e Hales, 1997).

Esses estudos conduziram a atenção para outros possíveis agressores durante esse período.

Estresse perinatal e comportamento alimentar

O estresse foi definido pela primeira vez, no início por Selye (1949), como a resposta do organismo a uma demanda externa.

Existem dois sistemas de resposta ao estresse, são eles: o agudo e o crônico. No estresse agudo há liberação de adrenalina com reações correspondentes ao padrão “luta ou fuga”; no estresse crônico os corticosteróides são liberados com a hiperativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (McEwen, 2002).

A ativação Aguda do sistema de estresse leva ao aumento da disponibilidade de energia, melhora do fluxo sanguíneo para órgãos alvos, alerta e vigilância (Tsigos et.al., 2002), melhorando as chances de sobrevivência do indivíduo.

Entretanto, a ativação crônica do sistema de estresse pode causar danos ao organismo devido ao aumento e secreção prolongada de corticosteróides (McEwen, 2002).

Os hormônios liberados em resposta ao estresse podem especificamente afetar o apetite. A noradrenalina (Halford, 2001) e o hormônio liberador corticotrofina (Takeda et al., 2004) podem suprimir o apetite durante o estresse, enquanto o cortisol age estimulando o apetite durante a recuperação do estresse (Takeda et al., 2004).

Recentemente, tem-se abordado a relação do estresse perinatal com distúrbios do comportamento alimentar (Licinio et al., 1996; Bjorntorp and Rosmond, 2000; Ryu et al., 2009).

Pesquisas anteriores em modelos animais apresentaram provas de que o estresse no ambiente pós-natal pode desenvolver uma série de efeitos duradouros sobre a fisiologia e o comportamento materno e dos filhotes (Plotsky, 1993; Kalinichev, 2002). Em ratos, o estresse materno promove o distúrbio na secreção e ação de glicocorticóide fetal, reduzindo o peso corporal, peso da supra renal e do pâncreas, bem como dos níveis de corticosterona e glicose (Lesage et al., 2004, Mairesse et al., 2007). Isso pode estar relacionado às alterações do comportamento alimentar e peso corporal da ninhada e relação entre o estado de ansiedade materna e ativação do eixo HPA.

A separação materna neonatal é considerado como um modelo de estresse animal no início da vida. Muitos estudos têm demonstrado o seu impacto permanente sobre a atividade do eixo HPA (Ladd et al, 1996; Van Oers et al, 1998; Vazquez et al, 2000; Kim et al, 2005; Ryu et al, 2008). O eixo HPA é o responsável pela liberação dos glicocorticoides que estão envolvidos no controle do balanço energético (Strack et al 1995; Cavagnini et al., 2000).

Em ratos, o estresse materno promove o distúrbio na secreção e ação de glicocorticóide fetal (Lesage et al., 2004), podendo levar a alterações do comportamento alimentar e peso corporal. Já em humanos, o estresse leva ao aumento de cortisol com maior ingestão de alimentos hipercalóricos (Epel et. al., 2001). Ocasionando balanço energético positivo e conseqüentemente a obesidade.

Os glicocorticóides possuem receptores em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, induzindo a liberação de Neuropeptídio Y, um potente estimulador do apetite (Schwartz, 2000). A exposição crônica ao estresse parece promover aumento no consumo de alimentos ricos em lipídios e glicídios, ou seja, alimentos altamente palatáveis (Dallman et. al., 2005). Além disso, a exposição a elevados níveis de glicocorticóides, a longo prazo, pode ocasionar doenças neurológicas, metabólicas e cardiovasculares (Barker, 1996; Phillips et. al., 1998; Ward et. al., 2004).

Em modelos experimentais, ratos separados das mães durante o período de lactação, apresentaram na vida adulta aumento da ingestão calórica, e da ansiedade, comportamento de limpeza exarcebado e na secreção de dopamina (Meaney et al 2002). O aumento no consumo alimentar parece estar relacionado a

alimentos palatáveis como solução rica em lipídeos e em carboidratos. Dentro desse contexto, evidencia-se a importância de buscar, em modelos experimentais, explicações para as repercussões comportamentais do estresse neonatal sobre o comportamento alimentar na vida adulta, para compreensão e prevenção de doenças.

Hipóteses

O presente estudo lança as seguintes hipóteses que dão base aos objetivos propostos:

- ✓ Ratos neonatos submetidos a separação materna desenvolvem aumento no consumo alimentar quando submetidos a estresse agudo na vida adulta;
- ✓ O estresse por separação materna promove retardo no disparo dos mecanismos de saciedade na vida adulta, o que propicia ao aumento no consumo alimentar

Objetivos

GERAL

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

ESPECÍFICOS

- Observar a seqüência comportamental de saciedade em resposta ao estresse alimentar aos 180 dias de vida;
- Analisar quantitativamente a ingestão de dieta hiperpalatável após estresse alimentar aos 180 dias de vida;

Materiais e Métodos

Animais

Para o estudo foram utilizados ratos machos e fêmeas albinos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em condições padrões de biotério com temperatura de 23° (± 1), ciclo claro-escuro de 12-12h (com luzes acesas às 18h) e livre acesso à água e ração (dieta caseína S/A). 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). Foi realizado acasalamento na proporção de duas fêmeas (nulíparas) para um macho. Após constatada a gestação, por aumento do peso corporal, as fêmeas eram 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 sexagem e redução da ninhada realizada no dia um. Cada ninhada era constituída de oito ratos. Após o desmame os animais eram mantidos em caixas com dois animais cada, recebendo dieta padrão de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition – AIN (Reeves et al, 1993) até os cento e oitenta dias de vida quando foram submetidos aos testes.

Estresse neonatal

O modelo de estresse neonatal utilizado foi o de separação materna. Cada ninhada foi dividida em dois grupos de quatro animais, correspondentes ao grupo estresse e controle. O grupo controle foi dividido em Controle Fêmea (CF), Controle Macho (CM). Enquanto o grupo estresse será dividido em Separação Materna Macho (SMM) e Separação Materna Fêmea (SMF). Animais do grupo estresse eram submetidos a separação periódica de suas mães e irmãos por seis horas do primeiro ao décimo quarto dias de vida. A separação ocorreu sempre no mesmo horário, das nove às quinze horas. Todos animais de uma ninhada foram identificados com marcações realizadas sobre o pelo permitindo a separação dos grupos e a obtenção

do peso corporal individual semanal. A partir do primeiro dia de vida, os animais do grupo estresse foram retirados de suas gaiolas e acomodados em gaiola com características semelhantes aquelas de origem, exceto pela ausência da mãe, ração e por conter mecanismo de controle da temperatura entre 30-32 graus (Plotsky et al, 2000).

Reatividade ao estresse

Aos cento e oitenta dias de idade, os animais foram submetidos ao estresse alimentar. Aos cento e setenta dias de idade, os ratos foram transferidos para gaiolas individuais para adaptação ao isolamento por dez dias. Durante esse período, era inserido em suas gaiolas um recipiente que foi utilizado para o estresse alimentar. Após a adaptação, os animais foram submetidos a privação alimentar de quatro horas, com livre acesso a água. O estresse alimentar consistiu da presença de alimento palatável na gaiola mas sem acesso pelo animal. Assim, após o período de quatro horas de privação alimentar, os animais receberam em suas gaiolas um recipiente com dieta palatável que apenas permitiu as informações visuais e olfativas. Após quinze minutos de estresse os animais tiveram acesso à dieta e foram realizadas as análises do comportamento alimentar.

Seqüência Comportamental de Saciedade

Para a avaliação da seqüência comportamental de saciedade, os animais dos grupos controle e estresse foram mantidos previamente em privação alimentar de quatro horas pela retirada da ração de suas gaiolas. Após este período, o alimento com peso conhecido era oferecido para dar início ao registro comportamental.

- Alimentação: O registro desse comportamento foi iniciado imediatamente quando o rato era observado junto ao comedouro iniciando a ingestão de ração. O mesmo era finalizado no momento em que o rato abandonar o comedouro.
- 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.

- Repouso: O rato foi observado em posição de descanso, apresentando o corpo repousado sobre o assoalho da gaiola.

A Ingestão alimentar foi obtida pela diferença do peso da ração antes e após a observação comportamental. A duração dos comportamentos foi quantificada em minutos por análise de registro por filmagem. Para tal, câmeras infra-vermelhas foram fixadas em pontos estratégicos da sala de estudo comportamental e foram acopladas a sistema de captura de imagem em um computador. A análise dos filmes foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador que desconhecia o grupo experimental de cada animal, evitando qualquer influência sobre os resultados.

Análise Estatística

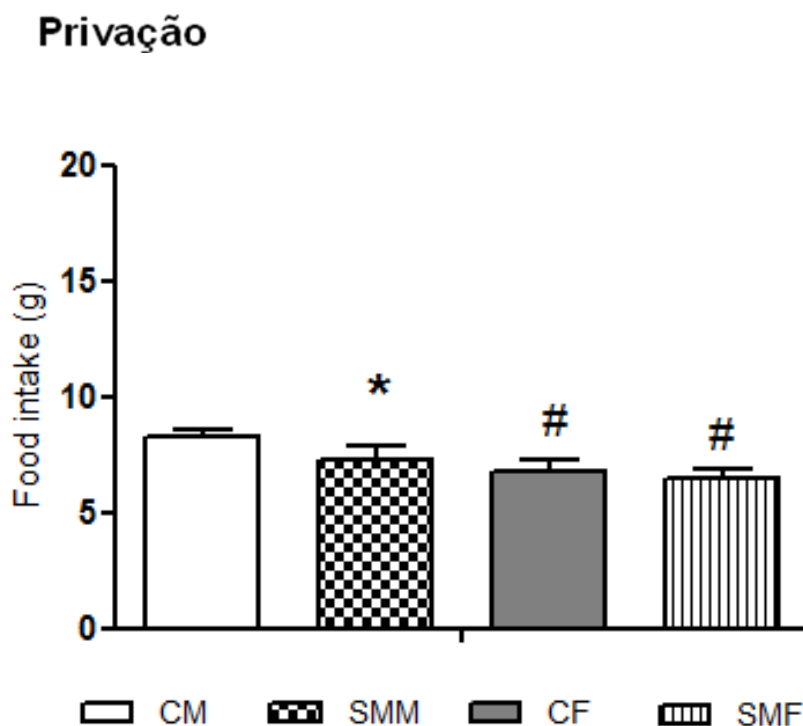
Na comparação dos diferentes grupos, foi empregada a ANOVA para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou diferença significativa, foi utilizado o teste de Tukey para identificar as diferenças entre os grupos. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney.

Resultados

Consumo de dieta padrão e palatável em resposta a privação alimentar

Houve redução da ingestão de dieta padrão em resposta a privação nos grupos de separação materna, comparados aos grupos controles, **(Fig.1)** . Resultados contrários foram observados para a ingestão de dieta palatável, que foi maior ($p < 0,05$) para machos e fêmeas que foram separados das mães comparados aos seus respectivos controles **(Fig. 2)**.

INGESTÃO ALIMENTAR



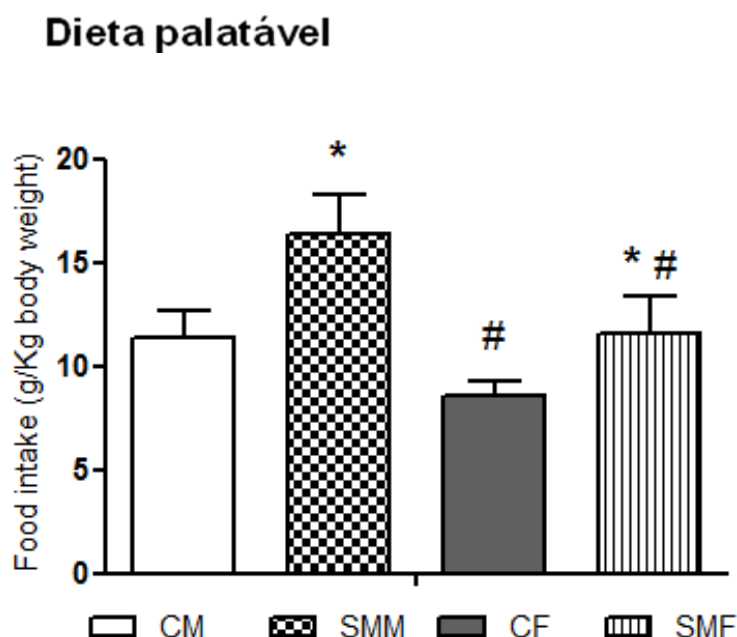


Figura 1 e 2 - Efeito do período de SM sobre a INGESTÃO DE DIETA PADRAO APÓS PRIVAÇÃO ALIMENTAR E dieta palatável $P < 0,05$ * diferença entre grupos com separação materna e controle (CM x SMM; CF x SMF); # diferença entre machos e fêmeas dos respectivos grupos (CF x CM; SMM x SMF).

Duração da seqüência comportamental de saciedade durante o tempo total

Os dados gerais da seqüência comportamental de saciedade estão expressos na Tabela 1. O grupo controle (**CM**) apresentou maior ($p < 0,05$) tempo de alimentação e menor descanso quando comparado ao estresse (**SMM**). A duração do comportamento de limpeza foi maior ($p < 0,05$) no grupo **SMM** em relação ao **CM**.

Tabela 1 – Dados da seqüência comportamental de saciedade em animais controle e/ou estressados durante o período de lactação.

Grupos experimentais	Alimentação	Limpeza	Descanso
CM	196 ± 52,2	29 ± 16,6	39,5 ± 19,8
SMM	163 ± 30,4	34 ± 32,4	35,5 ± 34

Os dados estão expressos em média ± DP. * Indica diferença entre os grupos **CM** e # indica diferença com o **SMM**.

Discussões

O presente trabalho propôs estudar as repercussões da separação materna durante a lactação sobre o comportamento alimentar em ratos.

Pesquisadores propuseram que a interação entre mãe e filhotes é crítica no desenvolvimento de muitas espécies e que a separação materna afeta funções fisiológicas e comportamentais em suas ninhadas na vida adulta (Iwasaki S. et al, 2000).

Nesse estudo foi encontrado um aumento na ingestão alimentar, tais achados estão de acordo com Iwasaki S. et al (2000) em que encontrou resultados significantes em relação aos parâmetros da ingestão alimentar, observados no início da vida dos animais, entretanto a separação materna altera respostas ao estresse em um período tardio da vida (Kuhn C. et al, 1990; Levine S. et al, 1991).

Estudos com separação materna durante 6 horas diárias encontraram aumento do consumo alimentar a partir da 9ª semana de vida dos animais, em relação ao grupo controle. (Forbes N. et al, 1996), outros estudos observaram o aumento no consumo de solução de sacarose. (Michaels C., 2007).

O aumento da ingestão alimentar na vida adulta do rato, esta relacionada há alterações na expressão hipotalâmica e nas características do eixo HPA, o que contribuem com as desordens alimentares, estas alterações hipotalâmicas são decorrentes dos receptores de glicorticoides presente no neuropeptídeo Y do núcleo arqueado (Aguirre J. et al, 1991).

Este estudo propõe a hipótese da programação fetal, ou seja, qualquer insulto ambiental no período crítico de desenvolvimento pode levar a repercussões na vida adulta (Lucas, 1991), entretanto, a separação materna em ratos mostrou vários efeitos comportamentais, endócrino e fisiológico nos sistemas neuroquímicos, em períodos tardios da vida do rato (Hofer M., 1993).

Alguns destes levantamentos encontrados na literatura trazem justificativas como nos estudos de Inoue K. et al (1998) onde foi visto que ratos separados das mães no período de lactação são hiperfágicos na vida adulta.

Os achados da Sequência Comportamental de Saciedade mostraram um aumento na duração da limpeza em ratos que foram separados das mães quando comparados ao grupo controle durante a lactação. Estudos mostraram um aumento da limpeza em ratos que foram separados das mães periodicamente (Von-Hoersten S., 1993), estes animais mostraram uma sensibilidade ao estímulo ambiental com diminuição da secreção do hormônio de crescimento. Estes animais separados em períodos precoces exibem mudanças no eixo HPA.

O que foi observado é que a separação materna repercute de forma mais intensa no comportamento de limpeza sendo um indicativo de estresse.

Estas alterações são dependentes do aumento da ativação do eixo HPA, do tempo da separação entre mães e filhotes e do sexo, pois vários estudos também encontraram diferenças na ingestão alimentar entre ratos machos e fêmeas (Forbes N. et al, 1996)

Conclusões

Os dados desse trabalho de conclusão de curso, nos permitem concluir que o estresse, por separação materna, durante o período de lactação, alteram o comportamento alimentar após desmame, particularmente quanto ao aparecimento da saciedade aumentando a ingestão alimentar a dietas palatáveis independente do gênero.

Referências

AGUIRRE, J.A. et al. Changes in pituitary-adrenal activity regulate the central vasodepressor responses induced by neuropeptide Y and adrenaline in the awake unrestrained male rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 141, n. 1 p. 35-44. Jan. 1991. PMID: 2053445

ARMITAGE, J.A. et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. **Journal of Physiology**, v. 565, n 1, p. 171-184 . May. 2005.

BARKER, D.J. Osmond C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the Second World War. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 40, n.1, p. 37-44. 1986.

BARKER, D.J.P. The fetal origins of hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 14, Suppl. 5, p. 117-120. 1996.

BJORNTORP, P. et al. Hypertension and the metabolic syndrome: closely related central origin? **Blood Press**, v. 9, n. 2-3 , p. 71-82. 2000.

BROBEGGER, C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, p. 301-323. 2005.

CAVAGINI, F. et al. Glucocorticoids and neuroendocrine function. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 24, Suppl. 2, p. S77–S79. Jun. 2000.

DALLMAN, M.F.; Pecoraro, N.C.; la Fleur, S.E. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. **Brain Behavior and Immunity**, v. 19, n. 275–280. 2005.

DESAI, M.; Hales, C.N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, n. 2, p. 329-48, May. 1997.

EPEL, E. et al. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 37-49, Jan. 2001.

FORBES, N.A. et al. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. **Physiology & Behavior**, v. 60, p. 1481–1484. 1996.

GANGWISCH, J.E. et al. Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES I. **Journal Sleep**, v. 28, p. 1289–1296. 2005.

GLUCKMAN, P.D.; Hanson, M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Sciense**, v. 305, n. 5691 p.1733-6. Sep. 2004.

HALES, C. N.; Barker, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v.35, n.7, Jul, p.595-601. 1992.

HALFORD, J.C. Pharmacology of appetite suppression: implication for the treatment of obesity. **Current Drug Targets**; v. 2, p. 353–70. 2001

HOFER, M.A.; Brunelli, S.A.; Shair, H.N. The effects of 24-hr maternal separation and of litter-size reduction on the isolation-distress response of 12-day-old rat pups. **Developmental Psychobiology**; v. 26, n.8, p. 483-97. Dec. 1993. PMID: 8293894

INOUE, K. et al. Prefrontal and striatal dopamine metabolism during enhanced rebound hyperphagia induced by space restriction-a rat model of binge eating. **Biological Psychiatry**. v. 44, n.12, p. 1329-36. Dec. 1998.

IWASAKI, S. et al. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. **Physiology & Behavior**, v. 70, p. 551-6. 2000.

KALINICHEV, M. et al. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 131-40. 2002.

Kim, H.J., Yoo, S.B., Ryu, V., Kim, G.T., Jahng, J.W. The hypothalamic expression of corticotropin-releasing hormone by stress is blunted in the rat experienced maternal separation during neonatal period. **Society for Neuroscience Abstract**, 2005.

KNUTSON, K.L. Sex differences in the association between sleep and body mass index in adolescents. **Journal of Pediatrics**, v. 147, p. 830–834. 2005.

KOEHL, M. et al. Prenatal stress induces a phase advance of circadian corticosterone rhythm in adult rats which is prevented by postnatal stress. **Brain Research**, v. 759, p. 317–320. 1997.

KOEHL, M. et al. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo–pituitary–adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. **Journal of Neurobiology**, v. 40, p. 302–315. 1999.

KUHN, C.M.; Pauk, J.; Schanberg, S.M. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. **Developmental Psychobiology**, v. 23 n. 5, p. 395-410. Jul. 1990.

LADD, C.O.; Owens, M.J.; Nemeroff, C.B. Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. **Endocrinology**, v. 137, p. 1212-1218. 1996.

LESAGE, J. et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. **Journal of Endocrinology**, v. 181, p. 291–296, 2004.

LEVINE, S. et al. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. **Developmental Psychobiology**, v. 24, p. 547-58. 1991.

LICINIO, J.; Wong, M-L; Gold, P.W. The hipotalhamic – pituitary-adrenal axis in anorexia nervosa. **Psychiatry Research**, v. 62, n. 1, p. 75-83. Apr . 1996.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Foundation symposium**, v.156, p.38-50; discussion 50-5. 1991.

MAIRESSE, J. et al. Prenatal stress alters the negative correlation between neuronal activation in limbic regions and behavioral responses in rats exposed to high and low anxiogenic environments. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 765–776. 2007.

MACCARI, S.; Van Reeth, O. Circadian rhythms and sleep: effects of prenatal stress in rodents — an animal model for human depression. **Encyclopedia of Stress**, p. 1150–1151. 2000.

MCEWEN, BS. Harold and Margaret Milliken Hatch Laboratory of Neuroendocrinology, Rockefeller University, New York, New York Sex, stress and hippocampus: allostatic loading and the aging process. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 921-39. Sep-Oct. 2002.

MCEWEN, BS. Stress and hippocampal plasticity. **Annual Review of Neuroscience** v. 22, p. 105-22. 1999.

MEANEY, M.J.; BRAKE, W.; GRATTON, A. Evironmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neuobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 127-38 .2002.

MICHAELS, C.C.; Holtzman, S.G. Enhanced sensitivity to naltrexone-induced drinking suppression of fluid intake and sucrose consumption in maternally separated rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86 n. 4, p. 784-96. Apr. 2007. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17459462

PHILLIPS, D.I. et al. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83 n. 3, p. 757-60. Mar. 1998.

PLOTSKY, P.M. et al. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 778-90. Oct. 2000.

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 research. Molecular brain research**, v. 18, n. 3, p. 195-200. May. 1993.

REAVEN, G.M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-607. 1988.

REEVES, P.G.; Rossow, K.L.; Lindlauf, J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1923–1931. 1993.

REILLY, J.J. et al. Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. **British Medical Journal** v. 330, n. 7504, p. 1357. May. 2005.

RYU1, J-H. et al. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 1355–1362, 2008.

RYU, V. et al. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. **Brain Research**, v. 1295, p. 127-34. Oct. 2009.

SCHWARTZ, M.W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671. 2000.

SELYE, H; FORTIER, C. Adaptive reactions to stress. **Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease**, v. 29, p. 3-18. Dec. 1949.

STEPHAN, F.K. The “other” circadian system: food as a zeitgeber. **Journal of Biological Rhythms**, v. 17, p. 284–292. 2002.

STRACK, A.M. et al. Glucocorticoids and insulin: complex interaction on brown adipose tissue. **American Journal of Physiology**, v. 268 n. 5, Pt. 2, p. R1209-16. May. 1995.

SINGH, H. et al. Symptoms of obstructive sleep apnea in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Digestive diseases and sciences**, vol. 50, n. 12, p. 2338-43. Dec. 2005.

TAKEDA, E. et al. Stress control and human nutrition **The Journal of Medical Investigation**, v. 51, p. 139–45. 2004.

TSIGOS, C; Chrousos, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 53, p. 865-871. 2002.

VAN OERS, H.J.; DE KLOET, E.R.; LEVINE, S. Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. **Brain Research. Developmental Brain Research**, v. 111, n. 2, p. 245-52, Dec. 1998.

VAZQUEZ, D.M. et al. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. **Brain Research**, v. 855, p. 76-82. 2000.

VEENEMA, A.H. Neumann Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. ID. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 3, p. 463-7. Apr. 2009.

VON HOERSTEN, S. et al. Effect of early experience on behavior and immune response in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 5, p. 931-40. Nov. 1993.

VORONA, R.D. et al. Overweight and obese patients in a primary care population report less sleep than patients with a normal body mass index. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, p. 25–30. 2005.

WARD, A.M. et al. Fetal programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: low birth weight and central HPA regulation. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 3, p. 1227-33. Mar. 2004.

WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition**, v. 20, p. 63-68, 2004.