

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

DESMAME PRECOCE: EFEITOS SOBRE O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR EM RATOS JOVENS E ADULTOS

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

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

DESMAME PRECOCE: EFEITOS SOBRE O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR EM RATOS JOVENS E ADULTOS

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

Aluna: Ligia Pereira da Silva Barros
Orientadora: Lisiane dos Santos Oliveira

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

[reservado para folha de aprovação]

Dedicatória

A Deus todo-poderoso,
Que se faz presente em cada suspiro,
Garantindo fé e coragem para alcançar
A vitória nas batalhas que vou travando
Pela vida afora.

Agradecimentos

Agradeço de coração a todos que contribuíram para a realização dessa etapa de minha vida.

Aos meus pais que me concederam o dom da vida;

Ao meu esposo, companheiro de todas as horas;

Minha orientadora, pela paciência e dedicação;

Minha filha, pelo amor mais puro que já recebi;

Meus amigos, que nunca me abandonam;

Meus familiares: Sogros, tias, primos, madrinhas, pela ajuda e incentivo sempre que precisei;

A todas as estagiárias do anexo de anatomia, pela enorme contribuição para a realização desse trabalho;

A todos os professores do curso de graduação em nutrição do centro acadêmico de Vitória, pela ajuda período à período.

Resumo

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do desmame precoce sobre parâmetros do comportamento alimentar relacionados a saciedade e ao ritmo circadiano do consumo alimentar. Foram utilizados ratos wistar desmamados por separação materna nas idades de 15 (D15), 21 (D21) ou 30 (D30) dias de vida. O peso corporal foi avaliado diariamente até os 30 dias de vida e a cada 30 dias até 150 dias. A sequência comportamental de saciedade foi avaliada aos 35 e 100 dias de vida. Aos 90 dias, o ritmo circadiano de consumo alimentar foi avaliado a cada 4 horas por 3 dias consecutivos. Este trabalho demonstrou que o peso corporal não foi alterado, mas a sequência comportamental de saciedade demonstrou que o grupo D15 retardou a saciedade comparada ao grupo D30 aos 100 dias de vida. No estudo do ritmo circadiano do consumo alimentar, o desmame precoce (D15) alterou o consumo alimentar no período intermediário da fase clara e no período intermediário da fase escura. Em conclusão, nosso estudo demonstrou que o desmame precoce pode alterar o comportamento alimentar principalmente em relação a saciedade e ao ritmo circadiano de alimentação. É possível que a presença de outros estímulos ambientais durante o desmame precoce possa causar hiperfagia e desregular os mecanismos de homeostase e controle do peso corporal. Este estudo apóiam as teorias onde os insultos durante o início da vida podem ser fatores determinantes de distúrbios crônicos.

PALAVRAS CHAVES: Desmame precoce, comportamento alimentar, sequência comportamental de saciedade, programação, ritmo circadiano.

Abstract

The objective of this work was to study the effect of early weaning on circadian rhythm and the behavioral satiety sequence in adult rats. Male Wistar rat pups were weaned for separation from the mother at 15 (D15), 21 (D21) and 30 (D30) days old. Body weight was measured daily until 30 days age and after this age was measured every 30 days until pups were 150 days old. Behavioral satiety was evaluated at 35 and 100 days of age. At 90 days of age, the circadian rhythm of food intake was evaluated every 4 h for three days. This work demonstrated that body weight and food intake were not altered, but the behavioral satiety sequence demonstrated that the D15 group delayed satiety compared with the D30 group at 100 days of age. In the circadian rhythm of the food intake study, early weaning (D15) changed food intake in the intermediary period of the light phase and in the intermediary period of the dark phase. In conclusion, our study showed that early weaning may alter the feeding behavior mainly in relation to satiety and the circadian rhythm of feeding. It is possible that the presence of other environmental stimuli during early weaning can cause hyperphagia and deregulate the mechanisms of homeostasis and body weight control. This study supports theories that depict insults during early life as determinants of chronic diseases.

Keywords: Early weaning, feeding behavior, behavioural satiety sequence, programing, circadian rythm.

Sumário

Introdução com justificativa	9
Revisão da Literatura	10
Objetivos	13
Hipóteses ou questões investigativas	14
Metodologia.....	15
Resultados	18
Discussão.....	25
Conclusão	29
Referências	30
Anexos.....	34

Introdução com justificativa

Este trabalho de conclusão de curso intitulado “Desmame precoce: efeitos sobre o comportamento alimentar em ratos jovens e adultos” teve como objetivo estudar o comportamento alimentar de roedores em alguns de seus vários aspectos.

Foi elaborado como parte integrante da tese de doutorado intitulada “Desmame precoce: efeitos sobre a evolução do comportamento alimentar em ratos”.

O desmame precoce além de ser um problema da saúde pública pode ser considerado uma agressão nutricional que acarreta várias alterações fisiológicas. É escasso na literatura estudos que esclareçam as consequências tardias deste tipo de agressão sobre o comportamento alimentar. Dessa forma a execução deste trabalho, utilizando o modelo experimental da seqüência comportamental em ratos, fornece subsídios para melhor compreensão dos efeitos da relação entre o período de lactação, da interação mãe-filho e da ingestão alimentar neste período sobre a construção do comportamento alimentar. Além disso, este trabalho contribui para aquisição de conhecimento a respeito da programação do indivíduo em resposta as condições ambientais no início da vida.

Revisão da Literatura

O acontecimento de uma série de eventos celulares no sistema nervoso, durante o período de desenvolvimento, determina características definitivas presentes no adulto, tanto de caráter neuroquímico quanto morfofuncional (Morgane et al., 1993). Por ser esse um período de intensas modificações, se torna mais vulnerável à agressões (Morgane et al., 1993). Essa fase é denominada período crítico, pois leva a possibilidade de consequências permanentes decorrentes de injúria (Dobbing, 1964). O período crítico do desenvolvimento neural inicia-se por volta dos 21 dias pós-natal no rato (Morgane et al., 1993).

Para tornar mais clara a relação entre injúrias no período crítico e alterações posteriores, sugeriu-se o modelo da influência fenotípica, na qual o organismo adapta-se favoravelmente a um ambiente hostil anterior (Hales & Barker, 1992; 2001). Os autores acima citados relataram aspectos relacionados à desnutrição fetal e a incidência de diabetes tipo II na fase adulta (Hales & Barker, 1992). Foi observado, nesse estudo, uma adaptação do organismo a desnutrição perinatal, programando o metabolismo da insulina (Hales & Barker, 1992). E esta adaptação tende a aumentar a aptidão do organismo para um provável ambiente agressivo subsequente (Barker, 1992).

O desmame é um evento muito importante no início da vida dos mamíferos (Kikusui et al., 2008). Em ratos, o desmame acontece espontaneamente em torno da terceira semana pós-natal e continua até aproximadamente os 30 dias, quando o consumo de leite é encerrado por completo (Krecek E Kreckova, 1957; Henning, 1981).

O desmame precoce, além de ser uma agressão nutricional, pois priva o filhote do leite materno, também pode ser considerado um modelo de estresse neonatal, o qual já demonstrou aumentar as respostas autonômicas a agentes estressantes (Ito et al., 2006), provavelmente em decorrência da hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (Plotsky & Meaney, 1993; Ladd et al., 2000). Em longo prazo tem provocado alterações comportamentais como o aumento da ansiedade em ratos (Ito et al., 2006) e o aumento da agressividade em

camundongos (Nakamura *et al.*, 2008). Isso sugere que interações entre mãe e filho durante o pré-desmame ou final do período lactacional é importante para o desenvolvimento comportamental em roedores (Kanari *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2008). A carência materna nessa fase também tem sido associada com alterações no comportamento e em respostas fisiológicas ao estresse em filhotes na vida adulta (Liu *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000).

Outro comportamento que pode ser programado pelo tipo de nutrição e pela incidência de estresse no início da vida é o comportamento alimentar (Orozco-Solis *et al.*, 2009). O comportamento alimentar é uma resposta adaptativa, decorrente da demanda do ambiente interno e modulado por oportunidades e limitações impostas pelo ambiente externo (Blundell *et al.*, 1985). É regulado através da interação complexa entre mecanismos periféricos e centrais que controlam a fome e a saciedade (York, 1999).

Em estudos experimentais em ratos, pesquisadores observaram que o comportamento animal obedecia a um padrão (Bindra & Blond, 1958; Bolles, 1960). Assim, após se alimentarem os animais apresentavam um período bastante ativo com comportamentos de limpeza e locomoção. Outrossim, após esse período de intensa atividade, os animais passavam a apresentar uma postura de descanso. Em decorrência destas observações foi sugerida a existência de uma seqüência na qual, após a alimentação, os animais iniciavam uma variedade de atividades não alimentares e depois descansavam ou dormiam. Essa seqüência de comportamentos foi associada à saciedade, passando a ser denominada Seqüência Comportamental da Saciedade (SCS) (Smith *et al.*, 1974). Em 1975, a SCS foi utilizada pela primeira vez como um modelo experimental para o estudo da saciedade (Antin *et al.*, 1975). Recentemente foi demonstrado que a desnutrição no início da vida pode alterar a análise microestrutural da seqüência comportamental de saciedade (Orozco-Solis *et al.*, 2009).

O comportamento alimentar também pode ser influenciado pelo ritmo circadiano, um conjunto de oscilações biológicas dentro de aproximadamente 24 horas que influenciam diversas funções fisiológicas e comportamentos (Aschoff, 1984). No ritmo circadiano o ciclo de luz claro-escuro é o mais efetivo sinal que sincroniza o ritmo biológico com o ambiente (Ohta *et al.*, 2008) e está diretamente

relacionado com o comportamento alimentar (Tallett *et al.*, 2008). Dessa forma, agravos como a desnutrição, nos períodos iniciais da vida, podem resultar em alterações no ciclo circadiano do comportamento alimentar (Orozco-Solis *et al.*, 2009).

Apesar de conhecida a importância da nutrição e da interação mãe-filho durante o período neonatal para a consolidação do comportamento alimentar na vida adulto, ainda restam-nos alguns questionamentos a respeito da programação deste comportamento.

Objetivos

Geral:

- Investigar os efeitos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar em ratos jovens e adultos;

Específicos:

- Observar a evolução ponderal;
- Avaliar a seqüência comportamental de saciedade em ratos jovens e adultos;
- Estudar a ritmicidade alimentar em ratos adultos.

Hipóteses ou questões investigativas

Ratos submetidos a desmame precoce:

- Quando jovens:

- Não apresentam aumento no peso corporal ;

- Não apresentam atraso na saciedade.

- Quando adultos apresentam:

- Aumento no peso corporal;

- Atraso no disparo da saciedade;

- Manutenção do perfil alimentar predominantemente noturno com alteração no ritmo circadiano do consumo alimentar em alguns períodos.

Metodologia

Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Animais adultos foram transportados para um biotério de experimentação, com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas invertido (com luzes apagadas às 8 horas) e livre acesso à água e alimentação (dieta Labina – Purina S/A). Após 15 dias de adaptação os animais foram acasalados em gaiolas contendo um macho para duas fêmeas. O manejo e os cuidados seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do centro de ciências biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. . O dia de nascimento dos filhotes foi considerado o dia zero. Após o nascimento dos filhotes, os grupos experimentais foram delineados segundo o período em que ocorreu o desmame. Cada grupo experimental foi constituído pela mãe e dez neonatos machos, a partir da sexagem feita no dia 1 após o nascimento . Os filhotes permaneceram com a mãe até o dia estabelecido para o desmame.

Desmame

O desmame ocorreu de acordo com os grupos experimentais:

Grupo desmame precoce (D15): o desmame ocorreu por separação da mãe no 15º dia pós-natal (n= 8)

Grupo controle 21 dias (D21): o desmame ocorreu por separação da mãe no 21º dia pós-natal (n = 8).

Grupo controle 30 dias (D30): o desmame ocorreu por separação da mãe no 30º dia pós-natal (n = 8).

Avaliação do Peso Corporal

A aferição do peso corporal foi realizada em balança digital. A aferição do peso corporal foi realizada diariamente do 15º ao 30º dia pós-natal. A partir do 30º dias pós-natal o peso corporal foi aferido no 30º, 60º, 90º, 120º e 150º dia pós-natal.

Estudo da Seqüência Comportamental da Saciedade

O estudo da seqüência comportamental da saciedade ocorreu no 35º e 100º dia pós-natal.

No 30º dia de vida os filhotes desmamados foram transferidos para gaiolas individuais de PVC com paredes transparentes (54 x 30 x 20 cm) cinco dias antes da realização do experimento e transferidos da estante para o local de avaliação. O tempo de permanência, antes do experimento, nessas gaiolas é essencial para que o animal se adapte ao ambiente, evitando a interferência do estresse do isolamento inicial.

Neste estudo, cada animal dos diferentes grupos experimentais foram submetidos, no dia da avaliação, à privação alimentar para estimular a busca pelo alimento. Esta privação se constitui da retirada da ração por um período de 3 horas antes do experimento (13h30 às 16h30).

A observação comportamental teve início oferecendo-se ração (30g) aos animais. Durante a avaliação, foi registrada a duração (em segundos) dos comportamentos que constituem a seqüência comportamental de saciedade. Para o registro da duração dos comportamentos foram utilizados protocolo comportamental e cronômetro digital, permanecendo o observador a 1,5m de distância da gaiola em observação. Os testes foram realizados no período de 16h30 as 17h30, com o ciclo de luz no período escuro, com a presença de luz vermelha. Após o tempo de observação do comportamento alimentar o alimento foi pesado e protocolado.

Os comportamentos avaliados são os seguintes:

-Alimentação- O registro desse comportamento foi iniciado imediatamente após a observação do rato junto ao comedouro iniciando o consumo de ração. O mesmo foi finalizado quando o rato abandonar o comedouro.

-Limpeza- O comportamento de limpeza é um comportamento estereotipado constituído por sub-comportamentos que ocorrem em uma seqüência temporal definida. Inicia-se com o lambar de patas anteriores e movimentos dessas sobre a cabeça continuando-se a lambar a região ventral, dorso e patas posteriores. Normalmente ocorre de forma mais intensa após o comportamento de alimentação.

-Descanso- Esse comportamento foi registrado quando o animal não estiver exercendo nenhum outro comportamento se encontrando quieto na gaiola.

Estudo da Ritmicidade Alimentar

O estudo do ritmo alimentar foi realizado no 90º dia pós-natal.

Foi realizado uma curva alimentar de 24 horas, com o consumo alimentar de 4 em 4 horas, totalizando 6 períodos de 4 horas cada, sendo 3 períodos na fase clara e 3 períodos na fase escura. Esse estudo teve realização em 3 dias consecutivos e a partir daí foi realizada uma média de consumo por período de 4 horas. O consumo alimentar foi aferido através da diferença de peso (g) entre a quota de ração oferecida e a quota de ração rejeitada ao final de 4 horas.

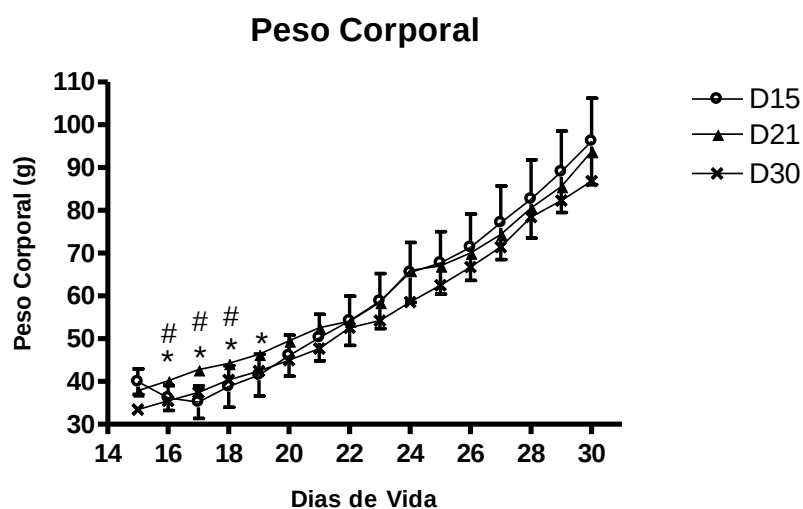
Análises Estatísticas

Todo os dados foram analisados no programa SigmaStat 2.03 demo. Os dados de peso corporal e os dados providos a partir da seqüência comportamental de saciedade foram analisados utilizando Anova one way seguida de teste de tukey para comparação múltipla entre os grupos. Antes de usar Anova, os dados foram submetidos ao teste de variância e normalidade com tolerância de 5%.

Resultados

No período após o desmame, foi observada redução ($p < 0,05$) do peso corporal dos animais do grupo D15. Entre o 16º e o 18º dia de vida o grupo D15 apresentou menor peso corporal em relação aos grupos D21 e D30 e no 19º dia de vida o peso corporal era menor em relação ao grupo D30. A partir do 20º dia de vida o peso corporal foi recuperado e não houve alteração em relação aos demais grupos (Figura 1A e 1B).

A



B

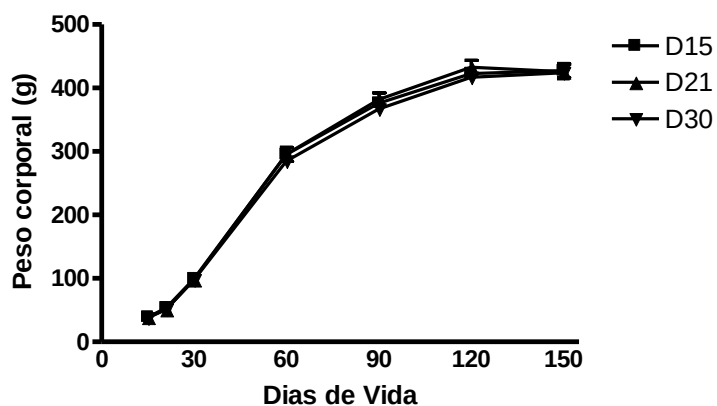


Fig. 1. Efeito da manipulação do período do desmame sobre o peso corporal de animais jovens (A) até a idade adulta (B). Os animais foram desmamados com 15 dias (D15) ou 21 dias (D21) ou 30 dias (D30). Os dados estão expressos em média $\pm$ DP. (*) diferença entre D15 e D21, (#) diferença entre D15 e D30 (One way anova seguida de teste de Tukey, $p > 0,05$).

Sequência comportamental de saciedade (SCS)

Aos 35 dias de vida, a sequência comportamental de saciedade apresentou-se de forma característica. A progressão dos comportamentos de alimentação, limpeza e descanso ocorreram sem a interrupção da sequência comportamental. A cada período de 5 minutos foi quantificada a duração de cada comportamento e não houve diferença entre os grupos experimentais nos 12 períodos avaliados (Figura 3).

O ponto de saciedade, considerado o ponto de encontro entre as curvas de alimentação e descanso, foi evidente aos 41 minutos no grupo D15, aos 39 minutos no grupo D21 e aos 36 minutos no grupo D30. Foi observado retardado de aproximadamente 5 minutos no disparo da saciedade no grupo desmame D15 em relação ao grupo D30 (Figura 3).

A taxa de alimentação (consumo alimentar/duração da alimentação) foi menor ($p < 0,05$) no grupo D15 comparado ao grupo D21. O grupo D30 não apresentou diferença em relação aos demais grupos (Tabela 1).

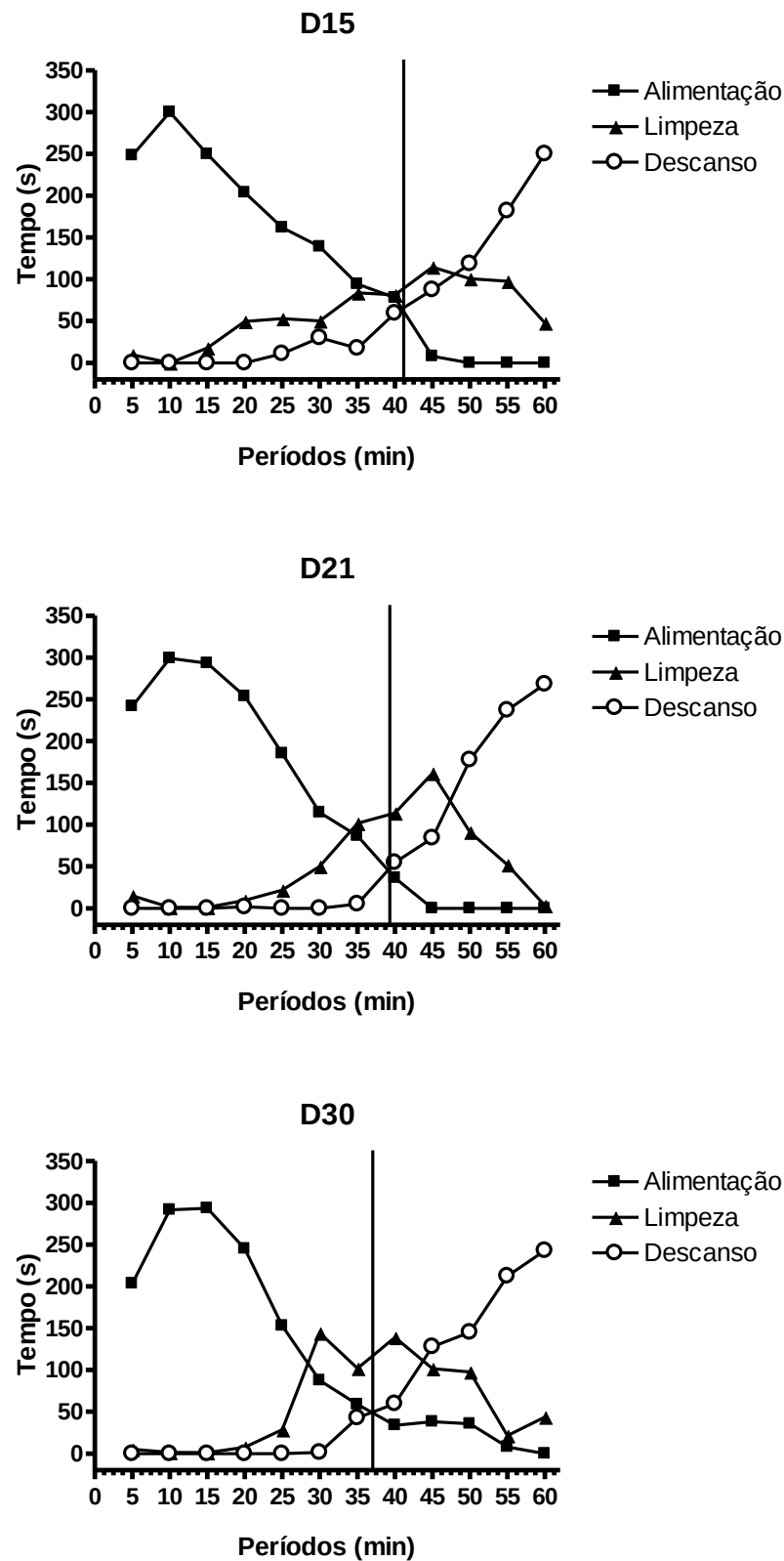


Fig.3. Efeito da manipulação do período de desmame sobre a sequência comportamental de saciedade em ratos com 35 dias de vida. Os animais foram desmamados com 15 dias (D15, n=10) ou 21 dias (D21, n=10) ou 30 dias (D30, n=10). Aos 35 dias de vida os animais foram submetidos a um período de 3 horas de jejum. Após o jejum foi oferecido 30g de ração e durante 1 hora foram avaliados, os comportamentos de alimentação, limpeza e descanso evidenciando o ponto de transição entre o comportamento de alimentação e descanso. Os dados estão expressos em média. Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$, Anova One Way seguida do teste de Tukey).

Tabela 1. Efeito do desmame precoce ou tardio sobre os parâmetros avaliados durante a seqüência comportamental de saciedade em ratos com 35 dias.

	D15	D21	D30
Consumo (g)	4,42 ± 1,56	6,22 ± 2,45	5,32 ± 1,00
Duração da Alimentação (s)	1482 ± 486	1509 ± 292	1448 ± 480
Duração da Limpeza (s)	706 ± 266	622± 330	694 ± 382
Duração do Descanso (s)	755± 591	752± 456	832± 600
Taxa local de alimentação (g/min)	0,17± 0,02 *	0,24± 0,07	0,22± 0,06
Taxa global de alimentação (g/min)	0,07± 0,02	0,10± 0,04	0,08± 0,02

Os dados estão expressos em média ± DP (*) diferença entre D15 e D21 ($p < 0,05$, Anova).

Aos 100 dias de vida, repetiu-se a avaliação da SCS e, a progressão dos comportamentos de alimentação, limpeza e descanso ocorreram novamente sem a interrupção da seqüência comportamental nos 3 grupos.

O ponto de saciedade ocorreu aos 43 minutos no grupo D15 ,aos 35 minutos no grupo D21 e aos 22 minutos no grupo D30. Dessa forma foi observado retardado de aproximadamente 21 minutos no disparo da saciedade no grupo D15 em relação ao grupo D30 (Figura 3).

Durante o período total da SCS foi observado que o grupo D15 apresentou maior duração ($p < 0,05$) do comportamento de alimentação que o grupo D30. O comportamento de limpeza não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos. Quanto ao comportamento de descanso foi observado que o grupo D15 e o grupo D21 apresentaram maior duração ($p < 0,05$) que o grupo D30 (Tabela 2).

Quanto aos parâmetros associados, observamos que o consumo alimentar no grupo D15 e no grupo D21 foi maior ($p < 0,05$) que no grupo D30 (Figura 6A), no entanto a taxa de alimentação não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos. (Tabela 2).

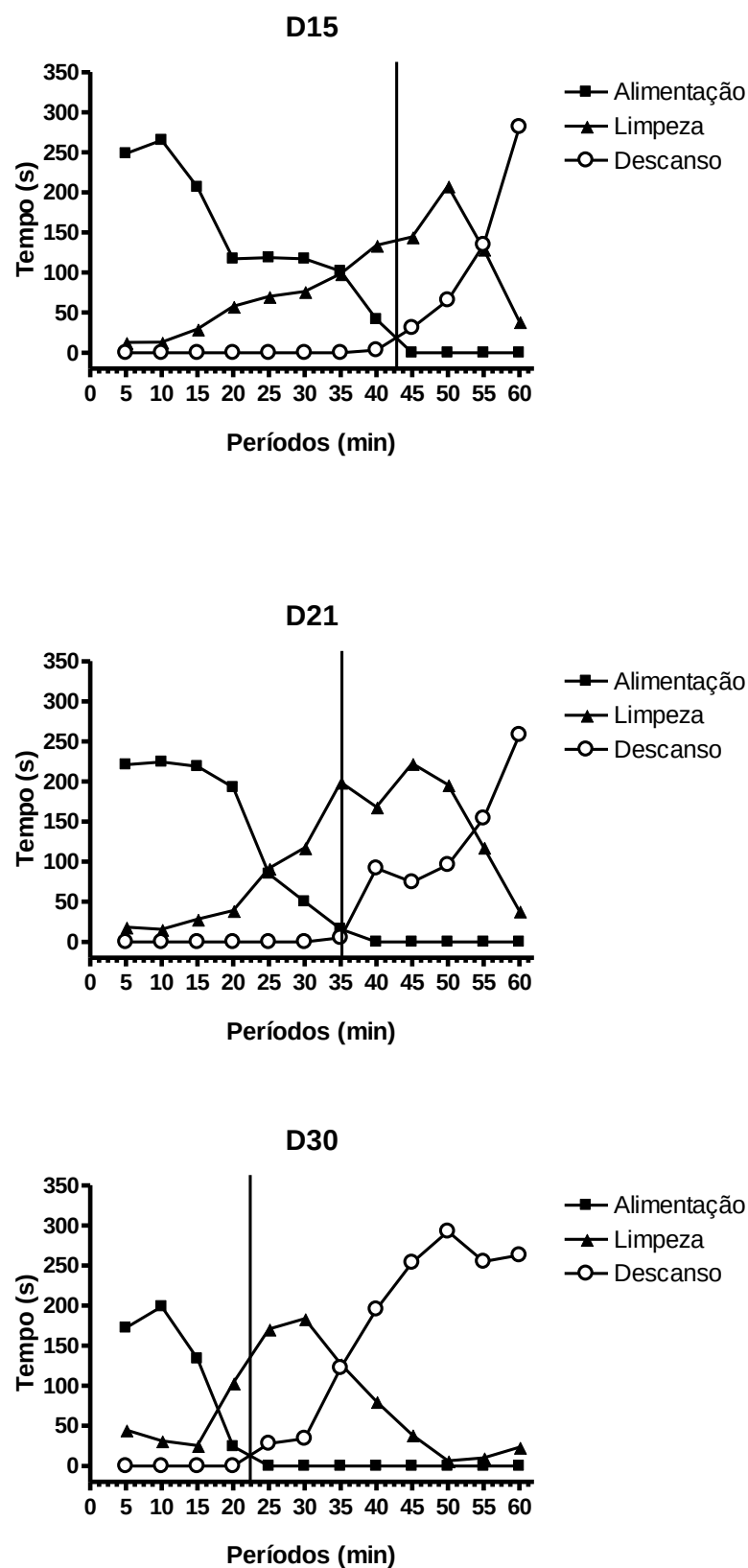


Fig.4. Efeito da manipulação do período de desmame sobre a sequência comportamental de saciedade em ratos com 100 dias de vida. Os animais foram desmamados com 15 dias (D15, n=10) ou 21 dias (D21, n=10) ou 30 dias (D30, n=10). Aos 100 dias de vida os animais foram submetidos a um período de 3 horas de jejum. Após o jejum foi oferecido 25g de ração e durante 1 hora foram avaliados, os comportamentos de alimentação, limpeza e descanso evidenciando o ponto de transição entre o comportamento de alimentação e descanso. Os dados estão expressos em média(Anova One Way).

Tabela 2. Efeito do desmame precoce ou tardio sobre os parâmetros avaliados durante a seqüência comportamental de saciedade em ratos adultos.

	D15	D21	D30
Consumo (g)	6,57 ± 1,26#	6,65 ± 1,29	5,12 ± 0,66 *
Duração da Alimentação (s)	1124 ± 383#	1007 ± 390	712 ± 242
Duração da Limpeza (s)	1013 ± 402	1253 ± 352	845 ± 304
Duração do Descanso (s)	516 ± 276#	680 ± 519	1443 ± 390 *
Taxa local de alimentação (g/min)	0,36 ± 0,08	0,36 ± 0,04	0,40 ± 0,09
Taxa global de alimentação (g/min)	0,11 ± 0,02#	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01 *

Dados expressos em média ± DP. (#) diferença entre 15 e 30, (*) diferença entre 21 e 30 (p<0,05, Anova one way).

Ritmo circadiano do consumo alimentar

Na fase clara, entre 22 e 02 horas, foi observado que o grupo D15 (1,45 ± 0,67; n=10) apresentou menor consumo alimentar (p<0,05) em relação ao grupo D30 (2,56 ± 1,37; n=10). Na fase escura foi observado que os grupos D15 (8,86 ± 1,79; n=10) e D21 (8,93 ± 1,25; n=10) apresentaram maior consumo alimentar (p<0,05) que o grupo D30 (7,19 ± 1,82; n=10) (figura 5).

Foi realizado um somatório do consumo alimentar durante a fase clara, durante a fase escura e o consumo diário. Durante a fase clara foi observado que o grupo D15 (4,59 ± 1,49) apresentou menor consumo alimentar (p<0,05) que os grupos D21 (6,26 ± 1,63) e o grupo D30 (6,20 ± 1,57). Durante a fase escura os grupos D15 (22,84 ± 2,70), D21 (22,67 ± 1,56) e D30 (21,66 ± 2,09) não apresentaram diferença (p>0,05) no consumo alimentar. No somatório de 24 horas não houve diferença no consumo alimentar entre os três grupos (p>0,05).

Ritmo Alimentar

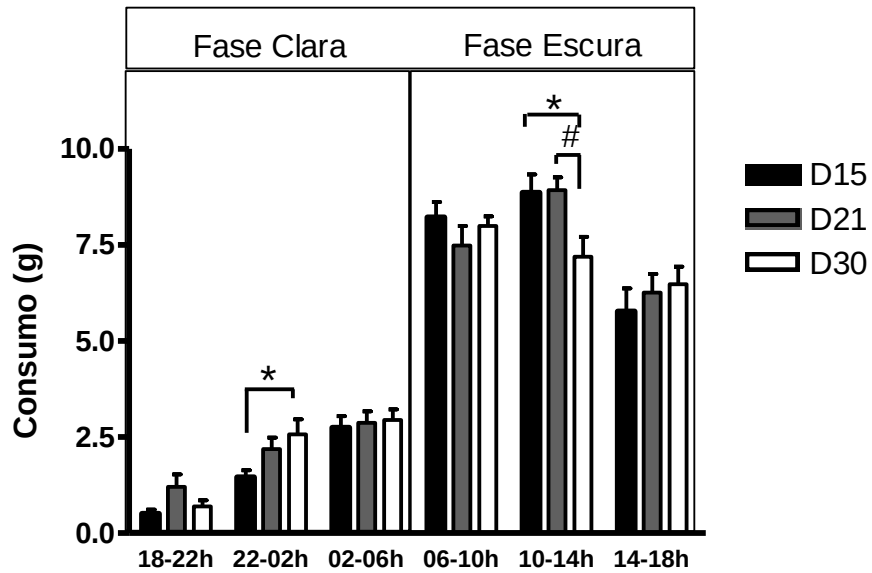


Figura 5. Efeito da manipulação do período de desmame sobre o ritmo circadiano do consumo alimentar em ratos adultos. (*) diferença entre D15 e D30. (#) diferença entre D21 e D30.

Discussão

No presente estudo, foi verificado o efeito do desmame precoce ou tardio sobre padrões comportamentais relacionados a saciedade e ao ritmo alimentar em ratos adultos. Foi demonstrado que a manipulação na idade do desmame modifica de forma duradoura a seqüência comportamental de saciedade e o ritmo do consumo alimentar. No entanto, o peso corporal e o consumo alimentar basal não sofrem variações.

A idade ideal para o desmame de ratos mantidos em laboratório ainda é controversa. O desmame com 21 dias de vida é a prática mais freqüente, porém, espontaneamente, o desmame começa por volta da terceira semana de vida e continua até a idade de 30 dias quando cessa o consumo de leite (Hahn and Koldovsky 1966). A partir do 14º dia de vida, os ratos iniciam o consumo de alimentos sólidos (Hahn and Koldovsky 1966) e já são capazes de comer, manter a temperatura corporal e evacuar sozinhos desde o 13º dia de vida (Plaut and Davis 1972). No nosso trabalho os animais considerados desmamados precocemente foram separados de suas mães com 15 dias de vida. Nessa idade ainda podem mamar, mas já podem sobreviver independentes de suas mães. É utilizada na literatura a escolha da idade entre o 14º e o 16º dia de vida para modelos de desmame precoce (Hahn and Kirby 1973; Ito, Kikusui et al. 2006; Kikusui, Ichikawa et al. 2009). No entanto, a idade de desmame utilizada para o controle nesses estudos é variável. Assim, há estudos que utilizam como controle animais desmamados com 21 dias de vida (Kikusui, Takeuchi et al. 2004; Kikusui, Nakamura et al. 2006; Kikusui, Kiyokawa et al. 2007; Nakamura, Kikusui et al. 2008), e outros utilizam o padrão de 30 dias (Hahn and Kirby 1973; Angel and Back 1981; Back and Angel 1982; Ito, Kikusui et al. 2006). No presente trabalho estudamos os efeitos do desmame precoce sobre alguns aspectos do comportamento alimentar tendo como controles o desmame ao 21º e ao 30º dia de vida, a fim de averiguar se a diferença entre essas duas idades de desmame provocam alterações no comportamento alimentar. No entanto, observamos que em todos os aspectos o

grupo D21 é muito semelhante ao grupo D15 e as diferenças só aparecem quando comparamos o grupo D15 ao grupo D30.

O desmame precoce acarretou perda de peso imediatamente após a separação materna sendo recuperado logo em seguida. O leite materno é responsável pela nutrição do neonato. Cerca de 69,8% de sua calorias são provenientes dos lipídios e apenas 6,8% das calorias são provenientes dos carboidratos (Azara, Maia et al. 2008). Já as dietas comerciais, inclusive a AIN-93, apresentam maior percentual de carboidratos (64%) e menos gordura (16,7%) (Reeves, Nielsen et al. 1993). Ao final da lactação, ratos iniciam o consumo de ração, mas ainda ingerem leite materno até o completo desmame. A mudança abrupta do consumo de leite para o consumo exclusivo de alimentos sólidos com composição nutricional diferente do leite materno pode ter provocado inicialmente a perda de peso. Até a vida adulta o desmame precoce não alterou o ganho de peso corporal. Já outros estudos observaram que o desmame precoce por inibição da lactação materna com bromoergocriptina provocou aumento do peso corporal (Bonomo, Lisboa et al. 2007; Bonomo, Lisboa et al. 2008; de Moura, Bonomo et al. 2009). No entanto, nossos resultados estão coerentes com o consumo alimentar basal que também não foi alterado pelo desmame precoce.

Foi estudado a seqüência comportamental de saciedade aos 35 e aos 100 dias de vida. O estudo da seqüência comportamental de saciedade aos 35 dias de vida demonstrou que o desmame precoce, apesar de não ter retardado significativamente o disparo da saciedade, causou redução da taxa de alimentação. A taxa de alimentação tem sido um parâmetro muito utilizado na literatura como um sensível indicador da ação de fármacos sobre o comportamento alimentar (Halford, Wanninayake et al. 1998). Essa taxa indica a velocidade com a qual o animal se alimenta. Não observamos diferença no consumo alimentar, porém o desmame precoce mostra uma tendência a reduzir o consumo alimentar sem alterar a duração do comportamento de alimentação sendo esta a causa da redução da taxa de alimentação.

Quando a seqüência comportamental de saciedade foi reavaliada na vida adulta observamos que quanto mais tardio foi o desmame mais rápido foi o disparo da saciedade. Também foi observado que o aleitamento mais duradouro provocou

menor consumo sem alterar a taxa local de alimentação e consequentemente precisou de menos tempo comendo para o aparecimento da saciedade. Como não há alteração no comportamento de limpeza o descanso também dura mais quando o disparo da saciedade é antecipado. Essa antecipação no disparo da saciedade provocada pela maior duração do período do aleitamento materno é muito semelhante ao padrão encontrado em estudos com a seqüência comportamental de saciedade em ratos tratados com doses agudas de CP-4,253, um agonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5HT-1b. A administração do CP-4,253 provocou a diminuição do consumo alimentar, da duração do comportamento de alimentação, mas sem alterar a taxa de alimentação e aumentou a duração do descanso (Lee, Kennett et al. 2002). Estudos demonstraram que o desmame precoce provoca a baixa expressão do 5HT-1b receptor mRNA no hipocampo (Nakamura, Kikusui et al. 2008), porém pouco se sabe sobre as repercussões do desmame precoce sobre os níveis desses receptores nos núcleos hipotalâmicos responsáveis pela saciedade. Entretanto, a incidência de estresse na terceira semana de vida reduz os níveis de serotonina no hipocampo, na amígdala e no hipotálamo (Matsui, Morimoto et al. 2009).

Ratos adultos apresentam um ritmo alimentar pronunciadamente noturno. Em laboratório com condições normais de ciclo de luz claro/escuro alternando a cada 12 horas, cerca de 75 a 80% do consumo alimentar ocorrem durante o período escuro (Mayer, Marshall et al. 1954). Nesse estudo esse padrão de consumo noturno foi preservado, todos os picos de alimentação ocorreram durante o período escuro. Entretanto, na vida adulta, o desmame precoce alterou o consumo de ração durante os períodos do meio da fase escura e do meio da fase clara. A ontogênese do ritmo alimentar é influenciada por fatores endógenos, e também pela influencia do comportamento materno (Levin and Stern 1975). Durante as duas primeiras semanas de vida nenhum ritmo alimentar é expresso através do consumo de leite materno nem pelo consumo de alimentos sólidos (Babicky, Ostadalova et al. 1970). Até o 14º dia os filhotes ainda mantém os olhos fechados (de Souza, Nogueira et al. 2004; Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2004) por isso não sofrem influência do ciclo de luz sobre o ritmo alimentar. Porém até o 18º dia o padrão de consumo de leite, expresso pelo ganho de peso é predominantemente diurno e é imposto pela mãe (Levin and Stern 1975). Quando os filhotes iniciam o consumo de alimentos sólidos,

este é imposto pela mãe porque elas assim o fazem e eles repetem o comportamento materno (Galef and Henderson 1972). Entre o 15º e o 18º dia de vida não há ritmicidade no consumo de alimentos sólidos (Levin and Stern 1975), apenas por volta do 19º dia de vida é que aparece o padrão noturno de alimentação e o controle desse padrão sofre influência endógena (Levin and Stern 1975). Dessa forma a ausência materna a partir do 15º dia de vida nesse trabalho, pode ter afetado esse aprendizado inicial e contribuído para detecção de alguma diferença no ritmo alimentar.

Conclusão

Em conclusão o estudo mostrou que o desmame precoce pode alterar o comportamento alimentar principalmente no que se refere a saciedade e ao ritmo circadiano da alimentação. É possível que na presença de outros estímulos ambientais o desmame precoce possa provocar hiperfagia e desregular os mecanismos de homeostase e de controle do peso corporal. Atualmente a população mundial vem sofrendo com a elevação na incidência da obesidade, uma patologia de origem multifatorial (Mattar et al.2009) e o desmame precoce vem sendo associado à presença de sobrepeso e obesidade em crianças (Sigulem et al. 2001). Esse estudo apóia as teorias que apontam os insultos durante os períodos iniciais da vida como fatores determinantes de doenças crônicas e podem embasar as estratégias de incentivo ao aleitamento materno. No entanto, o conhecimento acerca das alterações estruturais e fisiológicas que possam estar envolvidas com a regulação do comportamento alimentar ainda é escasso e estudos dessa natureza são necessários.

Referências

- ANGEL**, J. F. and D. W. Back (1981). "Immediate and late effects of premature weaning of rats to diets containing starch or low levels of sucrose." J Nutr **111**(10): 1805-15.
- ANTIN**, J., J. Gibbs, *et al.*(1975) Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats. J Comp Physiol Psychol, v.89, n.7, Sep, p.784-90. .
- ASCHOFF**, J. (1984). "Circadian timing." Ann N Y Acad Sci **423**: 442-68.
- AZARA**, C. R., I. C. Maia, *et al.* (2008). "Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups." Biol Res **41**(3): 317-30.
- BABICKY**, A., I. Ostadalova, *et al.* (1970). "Use of radioisotope techniques for determining the weaning period in experimental animals." Physiol Bohemoslov **19**(6): 457-67.
- BACK**, D. W. and J. F. Angel (1982). "Effects of premature weaning on the metabolic response to dietary sucrose in adult rats." J Nutr **112**(5): 978-85.
- BARKER**, D. J.(1998) In utero programming of chronic disease. Clin Sci (Lond), v.95, n.2, Aug, p.115-28. .
- BINDRA**, D. e J. Blond.(1958)' A time-sample method for measuring general activity and its components. Can J Psychol, v.12, n.2, Jun, p.74-6. .
- BLUNDELL**, J. E., P. J. Rogers, *et al.*(1985) Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating. Brain Res Bull, v.15, n.4, Oct, p.371-6.
- BOLLES**, R. C. (1960)Groomng behavior in the rat. J Comp Physiol Psychol, v.53, Jun, p.306-10.
- BONOMO**, I. T., P. C. Lisboa, *et al.* (2008). "Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat." J Endocrinol **198**(2): 331-7.
- BONOMO**, I. T., P. C. Lisboa, *et al.* (2007). "Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring." J Endocrinol **192**(2): 339-44

de SOUZA, S. L., M. I. Nogueira, et al. (2004). "Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment." Physiol Behav **82**(2-3): 375-9.

DEIRO, T. C., R. Manhaes-de-Castro, et al. (2004). "Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats." Braz J Med Biol Res **37**(10): 1503-9.

DOBBING, J. (1964) The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v.159, Feb 18, p.503-9.

GALEF, B. G., Jr. and P. W. Henderson (1972). "Mother's milk: a determinant of the feeding preferences of weaning rat pups." J Comp Physiol Psychol **78**(2): 213-9.

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

HALES, C. N. and D. J. Barker (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." Br Med Bull **60**: 5-20.

HANH, P. and L. Kirby (1973). "Immediate and late effects of premature weaning and of feeding a high fat or high carbohydrate diet to weanling rats." J Nutr **103**(5): 690-6.

HAHN, P. and O. Koldovsky (1966). "[Utilization of nutrients during postnatal development]." Pergamon Press, Oxford. **60**: 5-20.

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): 159-68.

HENNING, S. J. (1981). "Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism." Am J Physiol **241**(3): G199-214.

ITO, A., T. Kikusui, et al. (2006). "Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats." Behav Brain Res **171**(1): 87-93.

- KANARI, K., T. Kikusui, et al. (2005).** "Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats." Behav Brain Res **156**(1): 45-52.
- KIKUSUI, T., S. Ichikawa, et al. (2009).** "Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice." Psychoneuroendocrinology **34**(5): 762-72.
- KIKUSUI, T., Y. Isaka, et al. (2005).** "Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood." Behav Brain Res **162**(2): 200-6.
- KIKUSUI, T., Y. Kiyokawa, et al. (2007).** "Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice." Brain Res **1133**(1): 115-22.
- KIKUSUI, T., K. Nakamura, et al. (2006).** "Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice." Behav Brain Res **175**(1): 96-103.
- KIKUSUI, T., Y. Takeuchi, et al. (2004).** "Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice." Physiol Behav **81**(1): 37-42.
- KRECEK, J. and J. Kreckova (1957).** "[Development of control of water metabolism. III. Preference in water and milk selection by young rats.]" Cesk Fysiol **6**(1): 14-21.
- 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.
- LEE, M. D., G. A. Kennett, et al. (2002).** "5-HT_{1B} receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin_{1B} agonist CP-94,253." Psychopharmacology (Berl) **164**(1): 49-60.
- LEVIN, R. and J. M. Stern (1975).** "Maternal influences on ontogeny of suckling and feeding rhythms in the rat." J Comp Physiol Psychol **89**(7): 711-21.
- LIU, D., J. Diorio, et al. (1997).** "Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress." Science **277**(5332): 1659-62.
- LIU, D., J. Diorio, et al. (2000).** "Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats." Nat Neurosci **3**(8): 799-806.
- MATSUI, F., M. Morimoto, et al. (2009).** "Effects of stress of postnatal development on corticosterone, serotonin and behavioral changes." Brain Dev.

MATTAR, Rosiane; **TORLONI**, Maria Regina; **BETRAN**, Ana Pilar and **MERIALDI**, Mario.(2009) **Obesidade e gravidez**. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* [online]. Vol.31, n.3, pp. 107-110.

MAYER, J., N. B. Marshall, et al. (1954). "Exercise, food intake and body weight in normal rats and genetically obese adult mice." *Am J Physiol* **177**(3): 544-8.

MORGANE, P. J., R. Austin-Lafrance, et al. (1993)Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*, v.17, n.1, Spring, p.91-128.

NAKAMURA, K., T. Kikusui, et al. (2008). "Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning." *Behav Brain Res* **187**(2): 442-8.

OHTA, H., S. Xu, et al. (2008). "Maternal feeding controls fetal biological clock." *PLoS One* **3**(7): e2601.

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): 481-92.

PLAUT, S. M. and J. M. Davis (1972). "Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels." *Physiol Behav* **8**(1): 43-51.

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.

SIGULEM, D. M., J. A. Taddei, et al. (2001)Obesidade na infância e na adolescência. *Compacta Nutrição*, v.2, n.1, p.7-18. .

SMITH, G. P., J. Gibbs, et al. (1974).Cholecystokinin and intestinal satiety in the rat. *Fed Proc*, v.33, n.5, May, p.1146-9

TALLET, A. J., J. E. Blundell, et al. (2008)Behaviourally-selective hypophagic effects of naloxone in non-deprived male rats presented with palatable food. *Behav Brain Res*, v.187, n.2, Mar 5, p.417-27.

YORK, D. A. (1999)Peripheral and central mechanisms regulating food intake and macronutrient selection. *Obes Surg*, v.9, n.5, Oct, p.471-9.

ANEXOS

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, 27 de agosto de 2008

Ofício nº 54/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhaes de Castro**
Departamento de Nutrição – CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 005299/2008 - 76

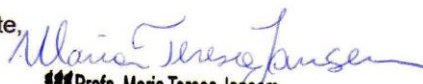
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"Desmame precoce: Efeitos sobre o comportamento alimentar em ratos jovens e adultos"**.

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 CEEAA-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,


 **Prof. Maria Teresa Jansen**
Presidente do CEEAA

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição
Animais: Ratos; Wistar; machos; com 1 - 150 dias de vida
Número de animais previsto no protocolo: 48 animais
Número de animais previsto por grupo: 16 animais