

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SILVIA ENES MARQUES

**INFLUÊNCIA DA REDUÇÃO DE NINHADA SOBRE O
COMPORTAMENTO MATERNO E RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E ENDÓCRINAS DA PROLE NA
FASE ADULTA**

ALFENAS/MG
2014

SILVIA ENES MARQUES

**INFLUÊNCIA DA REDUÇÃO DE NINHADA SOBRE O
COMPORTAMENTO MATERNO E RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E ENDÓCRINAS DA PROLE NA
FASE ADULTA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas - MG.

Área de Concentração: Fisiologia.

Orientador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

ALFENAS/MG
2014

Marques, Silvia Enes.

Influência da redução de ninhada sobre o comportamento materno e respostas comportamentais e endócrinas da prole na fase adulta / Silvia Enes Marques. - 2014.

93 f. -

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Comportamento materno. 2. Alimentação em excesso. 3. Obesidade. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD: 612

SILVIA ENES MARQUES

**INFLUÊNCIA DA REDUÇÃO DE NINHADA SOBRE O
COMPORTAMENTO MATERNO E RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E ENDÓCRINAS DA PROLE NA
FASE ADULTA**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Fisiologia.

Aprovada em: 17/02/2014

Profº. Dr. Alexandre Giusti- Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – MG

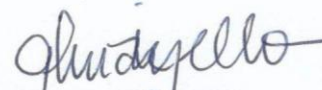
Assinatura:



Profª. Dra. Aline de Mello Cruz

Instituição: Universidade de São Paulo (USP-SP)

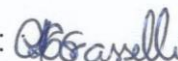
Assinatura:



Profª. Dra. Cristiane da Silva Marciano Grasselli

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – MG

Assinatura:



Dedico essa dissertação aos meus pais por imprimirem em mim coragem de ir atrás dos meus sonhos e ao meu esposo por trilhar comigo o sonho de Deus! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e à Virgem Maria, companhias constantes e sem os quais eu não teria vencido.

Aos meus pais, Ozório e Izabel pelo esforço em formar meu caráter e pelos sacrifícios para que eu pudesse estudar. Aos meus irmãos, Lívia e Humberto por todo apoio e incentivo. À vó Luzia, grande exemplo em minha vida, pelas orações e amor. Obrigada por sermos uma família e pela importância da nossa união.

Ao meu esposo Breno, pelo inesgotável carinho para comigo, pela amizade e compreensão nos momentos de ausência. Sem você eu não teria conseguido!

À família CMR por me ajudar a não me perder em meios às dificuldades e fazer do mestrado uma oportunidade de seguir minha vocação. Obrigada pelas orações, partilhas e apoio nessa jornada!

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva que me apresentou e me introduziu ao mundo da pesquisa, pelos conhecimentos ensinados, pela confiança, paciência e exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos amigos e companheiros do “Lab” por me ensinarem as técnicas, tirar minhas dúvidas, por tornar os vários dias de experimentos mais divertidos e menos cansativos pra mim. Pelos ensinamentos a cerca desta área, pelas ótimas discussões sobre temas pertinentes ao meu estudo e pela excelente convivência.

Aos técnicos José, Marina e Marília pela dedicação, atenção e grande cuidado com os animais.

À Antonieta, secretária da Pós-graduação pela simpatia e por estar sempre atenta às obrigações dos alunos da pós-graduação.

À UNIFAL-MG e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por permitirem a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao biotério central da UNIFAL, pelo fornecimento dos animais.

Aos ratos, sem os quais esse trabalho não teria sido viável.

A todos o meu sincero obrigada!

“Deus não entregou o mundo pronto pra gente.

***Deus valoriza o homem quando Ele dá inteligência e as mãos
para com isso o homem trabalhar e construir,
colocar a sua marca na criação de Deus.”***

Felipe Aquino

RESUMO

Durante as duas primeiras semanas de vida, a presença da mãe é indispensável para a sobrevivência dos filhotes. Em ratos, o comportamento materno (CM) desempenhado pelas fêmeas tem grande importância para o desenvolvimento adequado da prole. Alterações capazes de desencadear perturbações na relação mãe-filhote podem contribuir para alterações comportamentais e neuroendócrinas duradouras nos descendentes. Da mesma forma, o estado nutricional e hormonal em fases iniciais de desenvolvimento (gestação e lactação) estão relacionados a alterações epigenéticas, que podem levar ao desenvolvimento de doenças. Em estudos experimentais, a superalimentação neonatal por redução do número de filhotes por ninhada causa obesidade da prole e aumenta o risco de doenças cardiovasculares. No presente estudo avaliamos a influência da redução de ninhada sobre o comportamento materno de ratas lactantes e possíveis consequências nas respostas endócrinas e comportamentais nos filhotes durante a fase adulta. No 2º dia de lactação (DL), a ninhada foi reduzida para três filhotes (2 machos e 1 fêmea, grupo NR) e o grupo controle (NN) foi definido com 12 filhotes (máximo 6 machos por ninhada). O CM foi investigado ao longo da lactação por meio da avaliação do cuidado materno (CDM), ansiólise maternal e comportamento agressivo. As proles de ambos os grupos foram avaliadas aos 60 dias quanto à ingestão alimentar, ganho de peso, gordura corporal, perfil bioquímico e hormonal, além das respostas comportamentais. Os resultados das análises evidenciaram aumento no tempo gasto pela mãe de ninhada reduzida em parâmetros de cuidado materno com relevância, principalmente, no comportamento de lambar os filhotes e cifo. Em contraposição, houve diminuição no tempo gasto em parâmetros de atividade geral (alimentação e tempo longe dos filhotes) em mães que cuidavam de ninhada menor. As ratas NR ainda apresentaram aumento na ansiólise e no comportamento agressivo, principalmente nas 2 primeiras semanas de lactação, quando comparadas ao grupo NN. Com relação à prole, o grupo NR apresentou aumento de peso desde o 8º DL até a fase adulta, tanto machos quanto em fêmeas. Esses animais ainda apresentaram-se hiperfágicos do desmame até a fase adulta e maior adiposidade epididimal, ovariana e retroperitoneal (em machos e em fêmeas). O perfil bioquímico dos animais NR caracterizou um quadro de dislipidemia, com

aumentos nos níveis séricos de glicose, triglicérides, colesterol total, VLDL-c, LDL-c e diminuição nos níveis de HDL-c. A superalimentação neonatal ocasionou hiperleptinemia em ambos os sexos e aumento de insulina em fêmeas, que aparentemente está associado com o quadro de resistência à insulina e intolerância à glicose apresentado por esses animais. Quanto às respostas comportamentais, animais criados em ninhada reduzida apresentaram redução dos comportamentos relacionados à ansiedade e resposta ao medo, perfil semelhante ao apresentado por suas mães. Sugerimos que este "ambiente materno" favorecido pela redução do tamanho da ninhada foi fundamental para o desenvolvimento de alterações metabólicas e comportamentais na prole adulta.

Palavras-Chave: Comportamento materno. Redução de ninhada. Obesidade.

ABSTRACT

In rats the mother is essential for the survival of offspring, especially during the first two weeks of life. The maternal care (CM) spent by females has great importance for the proper development of the offspring. Thus, changes during the perinatal period are able to trigger disturbances in the relationship and can lead to lasting behavioral and neuroendocrine changes in the offspring. Likewise, nutritional and hormonal states in early stages of development (pregnancy and lactation) are related to epigenetic changes that may lead to the development of diseases. In experimental studies, neonatal overfeeding by reducing the number of pups per litter of offspring causes obesity and increases the risk of cardiovascular disease. In the present study we evaluated the influence of the reduction of litter on maternal care in lactating rats and possible consequences of endocrine and behavioral responses in the offspring during adulthood. To induce overeating neonatal, on the 2nd day of lactation (DL), the litter size was reduced to three pups (2 males and 1 female, NR group) and control group (NN) was set to 12 pups (maximum 6 males per litter). The CM was investigated during the lactation through assessment of maternal behavior, maternal anxiety and aggressive behavior. The effect of reducing litter in the adult offspring (60 days) on food intake, body weight, body composition, biochemical and hormonal levels were analyzed, in addition to behavioral responses. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The results showed that there was a significant increase in total maternal behavior mainly in the behavior of licking pups and arched-nursing, and a decrease in the total maternal behavior (diet and time away from the pups) in mothers caring reduced litter. These rats also showed reduced anxiety-related behavior and increased aggressive behavior, especially in the first 2 weeks. Concerning to offspring, the NR group showed increased weight from the 8th DL to adulthood, both males and in females. These animals still showed up hyperphagic weaning until adulthood and increase adipose tissue: epididymal fat, ovarian fat and retroperitoneal fat (in males and female). The biochemical profile of NR animals was representative of dyslipidemia, with increases in serum glucose, triglycerides, total cholesterol, VLDL-c, LDL-c and decrease in HDL-c. Neonatal overfeeding caused hyperleptinemia in both sexes and increased insulin in females, which is apparently associated with the framework of insulin resistance and glucose intolerance

displayed by these animals. Regarding behavioral responses, animals raised in small litter showed behaviors related to anxiety and fear reduced, as their mothers. Thus, it is concluded that "maternal environment" favored by the reduction in litter size was crucial to the development of metabolic and behavioral changes in the adult offspring.

Keywords: Maternal Behavior. Reducing litter. Obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** - Avaliação do cuidado materno de ratas com ninhada reduzida e com ninhada normal durante os 20 dias de lactação.....41
- FIGURA 2** - Avaliação dos parâmetros maternos de ratas com ninhadas reduzida e normal durante os 20 dias de lactação.....43
- FIGURA 3** - Avaliação dos parâmetros não-maternais de ratas com ninhada reduzida e ninhada normal durante os 20 dias de lactação.....44
- FIGURA 4** - Teste de campo aberto em ratas não lactantes, ratas com ninhada normal e ratas com ninhada reduzida ao longo do período lactacional.....48
- FIGURA 5** - Teste de labirinto em cruz elevado em ratas não lactantes, ratas com ninhada normal e ratas com ninhada reduzida ao longo do período lactacional.....49
- FIGURA 6** - Avaliação do comportamento agressivo de ratas lactantes com ninhada reduzida e com ninhada normal ao longo do período lactacional.....51
- FIGURA 7** - Taxa específica de ganho de peso de filhotes machos e fêmeas provindos de ninhada normal e ninhada reduzida.....54
- FIGURA 8** - Ingestão alimentar de filhotes machos provindos de ninhadas normal e reduzida.....55
- FIGURA 9** - Ingestão alimentar de filhotes fêmeas provindas de ninhadas normal e ninhada reduzida.....56

FIGURA 10 -	Perfil glicêmico dos ratos provindos de ninhada normal e ninhada reduzida mediante o teste de tolerância oral à glicose.....	60
FIGURA 11 -	Perfil glicêmico dos ratos provindos de ninhada normal e ninhada reduzida mediante o teste de tolerância intraperitoneal à insulina..	61
FIGURA 12 -	Teste de labirinto em cruz elevado em machos provindos de ninhada reduzida e de ninhada normal.....	63
FIGURA 13 -	Teste de labirinto em cruz elevado em fêmeas provindas de ninhada reduzida e de ninhada normal.....	64
FIGURA 14 -	Teste de campo aberto em machos provindos de ninhada reduzida e de ninhada normal.....	66
FIGURA 15 -	Teste de campo aberto em fêmeas provindas de ninhada reduzida e de ninhada normal.....	67
FIGURA 16 -	Teste de medo condicionado ao contexto em filhotes machos e fêmeas provindos de ninhada reduzida e ninhada normal.....	69

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 -** Parâmetros do cuidado materno em ratas lactantes com ninhada reduzida e ninhada normal.....46
- TABELA 2 -** Peso de proles criadas em ninhada reduzida e em ninhada normal durante o período lactacional.....52
- TABELA 3 -** Peso de proles criadas em ninhada reduzida e em ninhada normal do pós-desmame até a fase adulta.....53
- TABELA 4 -** Índice de Lee e adiposidade de proles adultas provindas de ninhada reduzida e de ninhada normal.....57
- TABELA 5 -** Perfil bioquímico de ratos adultos machos e fêmeas provindos de ninhada reduzida e de ninhada normal.....58
- TABELA 6 -** Perfil hormonal de ratos adultos machos e fêmeas provindos de ninhada reduzida e de ninhada normal.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β -HSD1	– Enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase 1
5HT1	– Receptor de serotonina tipo 1
ACTH	– Hormônio Adrenocorticotrófico
AgRP	– <i>Agouti-related Protein</i>
BST	– Estria da lâmina terminal
CA	– Campo aberto
CART	– Regulador de transcrição de cocaína e anfetamina
CDM	– Cuidado materno
CM	– Comportamento materno
CDMT	– Cuidado materno total
CNA	– Comprimento nasoanal
CDñMT	– Cuidado não materno total
CRH	– Hormônio liberador de corticotrofina
DL	– Dias de lactação
GLUT-4	– Transportador de glicose 4
GTT_o	– Teste de tolerância oral à glicose
HDL-c	– Lipoproteína de colesterol de alta densidade
HHA	– Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HOMA	– Modelo de avaliação homeostática
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRS-1	– Substrato 1 do receptor da insulina
ITTi	– Teste de tolerância intraperitoneal á insulina
JAK2	– <i>Janus kinase 2</i>
K_{ITT}	– Taxa de decaimento de glicose
LCE	– Labirinto em cruz elevado
LDL-c	– Lipoproteína de colesterol de baixa densidade
mPOA	– Área pré-óptica medial
NN	– Ninhada Normal
NPY	– Neuropeptídio Y
NR	– Ninhada Reduzida
ObR	– Receptor de leptina

OT	– Ocitocina
p.c.	– Peso Corporal
PI3K	– Fosfatidilinositol 3-quinase
PRL	– Prolactina
PVN	– Núcleo paraventricular
RI	– Resistência à insulina
RN	– Redução de ninhada
RNA_m	– Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	– Rotações por minuto
SA	– Superalimentação
SEM	– Erro padrão da média
SNA	– Sistema Nervoso Autônomo
SNC	– Sistema Nervoso Central
SNP	– Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	– Sistema Nervoso Simpático
SOCS3	– Supressor de sinalização de citocina 3
STAT3	– Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TG	– Triglicerídeos
TNF-α	– Fator de necrose tumoral α
TRH	– Hormônio liberador de tirotrópina
TyG	– Índice triglicerídeo/glicose
UI	– Unidade Internacional
VHM	– Hipotálamo ventromedial
VLDL-c	– Lipoproteína de colesterol de muito baixa densidade
WHO	– Organização Mundial da Saúde
α-MSH	– Hormônio estimulador de melanócito α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	COMPORTAMENTO MATERNAL E A RELAÇÃO MÃE-FILHOTE.....	18
1.2	PROGRAMAÇÃO METABÓLICA.....	24
1.2.1	<i>Modelo de programação pela superalimentação pós-natal</i>	25
1.3	OBESIDADE.....	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	ANIMAIS.....	31
3.2	ACASALAMENTO	31
3.3	PADRONIZAÇÃO DE NINHADAS	32
3.4	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS LACTANTES	32
3.4.1	<i>Avaliação do cuidado materno</i>	32
3.4.2	<i>Avaliação da ansiólise maternal</i>	33
3.4.2.1	Labirinto em cruz elevado.....	33
3.4.2.2	Campo aberto.....	34
3.4.3	<i>Avaliação do comportamento agressivo</i>	35
3.5	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	35
3.6	AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR DOS FILHOTES.....	35
3.7	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE NA FASE ADULTA.....	36
3.7.1	<i>Índice de Lee</i>	36
3.7.2	<i>Quantificação da adiposidade abdominal</i>	36
3.7.3	<i>Dosagens bioquímicas</i>	37
3.8	DOSAGEM HORMONAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA	37
3.9	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA (K _{ITT})	38
3.10	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA	39
3.10.1	<i>Medo condicionado ao contexto</i>	39
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40

4	RESULTADOS	41
4.1	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO EM RATAS LACTANTES	41
4.1.1	<i>Cuidado materno</i>	41
4.1.2	<i>Ansiólise maternal</i>	46
4.1.3	<i>Comportamento maternal agressivo</i>	50
4.2	GANHO DE PESO DA NINHADA	52
4.3	INGESTÃO ALIMENTAR DOS FILHOTES	54
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE.....	56
4.4.1	<i>Índice de Lee e Quantificação da adiposidade abdominal</i>	56
4.4.2	<i>Dosagens bioquímicas</i>	57
4.5	DOSAGEM HORMONAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA	58
4.6	TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE	59
4.7	TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA	60
4.8	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA	62
4.8.1	<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	62
4.8.2	<i>Campo aberto</i>	65
4.8.3	<i>Medo condicionado ao contexto</i>	68
5	DISCUSSÃO	70
5.1	EFEITO DA REDUÇÃO DE NINHADA SOBRE O COMPORTAMENTO MATERNO.....	70
5.2	CONSEQUÊNCIAS DA REDUÇÃO DE NINHADA E DO COMPORTAMENTO MATERNO NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E ENDÓCRINAS DA PROLE QUANDO ADULTA	73
6	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O estado nutricional e hormonal em fases precoces de desenvolvimento (gestação e lactação) está associado a alterações epigenéticas que podem levar ao desenvolvimento de doenças, como a obesidade. Em humanos, a obesidade infantil está relacionada com a ocorrência da obesidade na idade adulta, resistência à insulina e maior risco cardiometabólico (REILLY; KELLY, 2011). Em estudos experimentais com roedores, a superalimentação neonatal causa obesidade e aumenta o risco de doenças cardiovasculares (THOMPSON et al., 2007; DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; STRAUSSMAN et al., 2009; PLAGEMANN et al., 2010). Porém, pouco se sabe da influência do comportamento materno sobre a ninhada neste processo, uma vez que o ambiente materno torna-se fundamental para o desenvolvimento da prole.

1.1 COMPORTAMENTO MATERNO E A RELAÇÃO MÃE-FILHOTE

Em mamíferos, incluindo roedores, primatas e humanos, a mãe é a principal fonte que garante o alimento para os filhotes nas fases iniciais da vida. A relação mãe-ninhada se expande além da necessidade nutricional, uma vez que a mãe que provém a temperatura essencial dos filhotes no ninho, mantém-se atenta aos estímulos visuais, olfatórios e auditivos da ninhada (PRYCE et. al., 2001), principalmente durante as duas primeiras semanas de vida, pois os filhotes de ratos nascem parcialmente imóveis, desprovidos de pelos, surdos, cegos e incapazes de se locomover (GROTA; ADER, 1969; 1974).

O conjunto de cuidados que a mãe oferece aos filhotes é denominado comportamento materno (CM). O CM é constituído de uma série de comportamentos complexos, espontâneos, instintivos e com características espécie-específica determinadas por modificações fisiológicas que ocorrem pouco antes e logo após o parto (NUMAN, 1994; MATTSON et al., 2001). Durante o período de lactação, as mães apresentam comportamento de cuidar dos filhotes e manifestam-no pela busca dos mesmos quando estes se afastam do ninho, pela estimulação da micção

por meio da lambida anogenital, pelo posicionamento sobre os filhotes para provê-los nutrição e calor (GROTA; ARDER, 1969; STERN; JOHNSON, 1990; ALBERT; WALSH, 1995). Além de comportamentos de contato direto com os filhotes, o CM é constituído de condutas indiretas como a construção do ninho, comportamento agressivo, aumento da ingestão e diminuição do medo e da ansiedade (FLEMING; ROSENBLATT, 1974; ROSENBLATT, 1980; HANSEN; FERREIRA, 1986).

A agressão maternal consiste em comportamentos específicos executados pela mãe em relação a um intruso, com ou sem a intenção de lesá-lo (HUNTINGFORD, 1989). Ratas lactantes demonstram altos níveis de agressividade durante as duas primeiras semanas após o parto e, após este período, há um declínio na agressividade embora a lactação continue (GIONEVARO et al., 2005).

O comportamento agressivo maternal ocorre em um período específico da vida da rata, ao contrário dos machos que podem manifestar respostas agressivas de maneira contínua durante a vida (NUMAN, 1994). Ao contrário dos machos, uma considerável freqüência de mordidas das fêmeas é dirigida à cabeça e à região do focinho do intruso. As fêmeas apresentam o padrão de ataque frontal, o qual não é observado em machos dominantes (BLANCHARD; BLANCHARD, 1991). O ataque frontal é um comportamento súbito, muito rápido, pois não apresenta comportamentos associados como piloereção e/ou dorso arqueado. Esta forma de agressão que ocorre em resposta a uma ameaça ou medo é motivada pelo intruso e geralmente é precedida por fugas (BRAIN, 1981).

Em roedores, alterações comportamentais observadas após o parto parecem depender de mudanças hormonais que ocorrem no final da gestação, parto e início da lactação, bem como da presença dos filhotes (GIOVENARO et al., 2005). Os filhotes fornecem à mãe uma variedade de sinais táteis e olfatórios que são importantes para a manutenção da agressão maternal em ratas lactantes. O recebimento de sinais apenas visuais e auditivos é incapaz de manter a agressão maternal e a remoção cirúrgica desses sentidos não afetam o comportamento agressivo das mães (LOSTEIN; GAMMIE, 2002).

Diversas áreas hipotalâmicas e regiões límbicas como área pré-óptica medial (mPOA), núcleo para ventricular (PVN), amígdala e estria da lâmina terminal (BST), são responsáveis pelo desenvolvimento da agressão maternal. A atuação da ocitocina (OT) nessas regiões pode modular os cuidados maternos e a agressão maternal. No entanto, a participação da ocitocina na agressão maternal parece ser

de uma forma indireta, ou seja, a OT aumentaria a agressão maternal por diminuir a ansiedade. Isso seria um fato importante para que a rata lactante respondesse adequadamente a uma ameaça contra um macho intruso (BOSCH et al., 2005; BOSCH, 2010).

Alguns trabalhos correlacionam o aumento do comportamento agressivo com a diminuição do medo (LONSTEIN; GAMMIE, 2002). Ratas lactantes demonstram comportamentos relacionados à ansiedade diminuídos nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado quando comparadas com ratas não lactantes. A redução da ansiedade pode ser considerada parte de um repertório comportamental maternal e pode ser denominada como ansiólise maternal (FERREIRA et al., 2002).

A ansiólise maternal certamente é resultado de uma adaptação do Sistema Nervoso Central (SNC) que é necessária para a sobrevivência da prole. A responsividade reduzida à ansiedade observada durante a lactação pode ser explicada, pelo menos em parte, por um aumento da secreção de ocitocina e prolactina (PRL), já que ambas possuem propriedades ansiolíticas. Estudos anteriores demonstraram que altos níveis de OT e PRL relacionam-se à responsividade emocional observada na lactação (NUMAM, 1994; FLEMING; ROSEMBLATT, 1974; FLEMING; WALSH, 1994).

As respostas maternas de fêmea lactante mostram uma ritmicidade inversa ao seu ciclo de atividade, ou seja, estas são mais intensas na fase clara do dia (GROTA; ADER, 1969). As mães passam mais tempo junto dos filhotes durante o ciclo claro, pois o pico de temperatura corpórea materna ocorre durante a noite e a temperatura do ninho limita o tempo em que a mãe fica neste (LEON et al., 1984). A hipertermia aguda materna (induzida por altos níveis de progesterona, por exemplo) força a mãe a se afastar dos filhotes. Ratas lactantes passam significativamente mais tempo no ninho com filhotes hipotérmicos comparados a filhotes com a temperatura normal de 33° a 35°C (LEON; CROSKERRY; SMITH, 1978). A temperatura do ambiente pode também influenciar o tempo em que a mãe fica junto aos filhotes. Caso a temperatura do ambiente seja aumentada de 18° para 26°C observa-se menor contato com os filhotes (SCHELSTRAETE et al., 1992).

Esse cuidado dado pela mãe nos primeiros dias vida é considerado um fator crítico para o desenvolvimento adequado dos mamíferos, alterações nas interações mãe-filhote podem modificar a fisiologia e o comportamento da prole a curto e longo prazo (MEANEY, 2001).

A interrupção de estímulos sensoriais providos pela mãe tem efeitos negativos no desenvolvimento da ninhada em muitas espécies (SCHANBERG; KUHN, 1980; PAUK et al., 1986). Em geral, animais que foram afastados da mãe no período neonatal apresentam menor atividade no campo aberto (OGAWA et al., 1994). Quando adultos, os animais privados do contato maternal mostraram aumento nos comportamentos relacionados com ansiedade. Biagini et al. (1998), observaram que os ratos separados por 5 horas por dia do 2º ao 6º dia pós-parto apresentaram, quando adultos, maior secreção de corticosterona após uma sessão de indução ao estresse. Privação maternal também altera componentes específicos dos sistemas neurais envolvidos na regulação dos hormônios do estresse. A perda de contato com a mãe do 9º ao 12º dia pós-parto resulta em uma redução na expressão de mRNA do receptor de mineralocorticoide na região CA1 do hipocampo (VAZQUEZ et al., 1996). Além disso, há um aumento significativo na expressão de mRNA de c-fos no PVN e uma diminuição paradoxal de mRNA do hormônio liberador de corticotropina (CRH) após privação materna (SMITH et al., 1997), alterando a resposta ao estresse.

O controle e manutenção do CM envolvem fatores neuroendócrinos e neuroanatômicos. A primeira fase da regulação determina o início rápido do CM no pós-parto, sendo controlada por hormônios relacionados com a gestação e lactação (estrógeno, progesterona, prolactina e ocitocina). A segunda fase, de manutenção durante a lactação, é controlada principalmente por fatores não hormonais, na qual o estímulo proveniente do filhote se mostra de grande importância (NUMAN, 1994). Stern e colaboradores (2002) observaram que o ato de mamar regula o reflexo de ejeção do leite nas mães, por meio da liberação de hormônios como a ocitocina e propõem algumas modificações nas vias neuroanatômico-funcionais que regulam esses fenômenos, bem como no comportamento de cifose, envolvendo as colunas dorsolaterais da medula espinhal e a substância cinzenta pequiaquedutal. O contato com os filhotes também é responsável por atrair a atenção da mãe através de algumas ações exibidas por eles, como vocalizações e movimento do corpo e por estímulos olfatórios (JANS; LEON, 1983). Tais fatores permitem a promoção ou até mesmo surgimento do comportamento materno.

A relação mãe-filhote pode ser estudada ao examinar os componentes do comportamento materno. Em roedores, o comportamento de amamentação que ocorre entre a mãe e seus filhotes recém-nascidos envolve a participação de ambos

os membros. Quando separados de suas progenitoras, os filhotes sinalizam para a mãe recolhê-los através de dicas olfativas, visuais e auditivas. Após a mãe recolher seus filhotes para o ninho, ela então os cobre com o corpo e os lambe (WILKINS; LOGAN; KEHOE, 1997). O ato de lambar é um importante estímulo tátil que pode influenciar no desenvolvimento social de machos e fêmeas adultos, incluindo o comportamento sexual (BIRKE; SADLER, 1987; MOORE; POWER, 1992). Este comportamento também influencia o comportamento materno futuro. Filhotes fêmeas que receberam maior quantidade de lambidas ficaram mais tempo com os filhotes quando tornaram-se mães (FRANCIS et al., 1999). Além disso, a lambida favorece a reposição de água e eletrólitos pela mãe, já que ela ingere parte da urina dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1985).

A estimulação feita pelos filhotes não só influencia o comportamento materno, mas também a responsividade da mãe ao estresse (WALKER et al., 2004). As interações filhote-mãe requerem circuitos de aproximação social e de motivação intactos. Os sistemas ocitocinérgico e opióide estão envolvidos na motivação do filhote de camundongo em procurar contato social com sua mãe, talvez agindo através de circuitos de recompensa no encéfalo (YOUNG et al., 1997; MOLES; KIEFFER; D'AMATO, 2004). Quanto a estudos com ratos, foi sugerido que, principalmente até o 10º dia pós-parto, os filhotes apresentam uma circuitaria neural peculiar adaptada a desenvolver um forte apego pela mãe, não importando a qualidade de cuidado materno recebido (MORICEAU; SULLIVAN, 2005). Filhotes de ratos que foram lambidos e afagados frequentemente por suas mães apresentam liberação de ocitocina (PEDERSEN; BOCCIA, 2002). Há evidência de que a OT endógena durante o período neonatal tenha efeitos organizadores na expressão de comportamentos adultos relacionados à ansiedade e das respostas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ao estresse agudo. O sistema serotoninérgico nos filhotes via receptores 5-HT1A e 5-HT1B é responsável pela resposta vocal à separação da mãe (INSEL; WINSLOW, 1998).

O sistema dopaminérgico neonatal pode ter um papel importante na mediação do comportamento do filhote e nas interações mãe-filhote (WILKINS et al., 1997). Já foi proposto que as monoaminas, particularmente a noradrenalina (NA), têm um papel crucial no desenvolvimento do apego de um filhote pela sua mãe (KRAEMER; 1992; MORICEAU; SULLIVAN, 2005).

A presença materna, por sua vez, tem um papel importante na regulação do eixo HHA (SUCHECKI et al., 1995), o que pode ser observado nos experimentos de separação materna (MEANEY; BRAKE; GRATTON, 2002; VAN OERS et al., 1998). Uma das consequências do prejuízo da interação mãe-filhote é a inibição funcional das vias neurais que são responsáveis pela ativação da cascata neuroendócrina requerida para evocar uma resposta do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (VAN OERS et al., 1998).

O comportamento materno modula ainda as respostas comportamentais dos filhotes quando adultos. Os filhotes de mães muito lambedoras exibem um aumento do comportamento exploratório no campo aberto, uma latência menor e um tempo maior de alimentação em um ambiente novo e menor tempo de imobilidade e enterramento no teste de “*shock-probe burying*”, quando comparados com filhotes de mães pouco lambedoras (CALDJI et al., 1998; MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004). Essa diferença individual no comportamento materno é capaz de não influenciar somente na responsividade às emoções, mas parece também modular a função reprodutiva e o comportamento sexual de machos e fêmeas na fase adulta (URIARTE et al., 2007; CAMERON et al., 2005; GANS; MCCLINTOCK, 1993; LEHMANN; ERSKINE, 2004).

A importância do período perinatal no desenvolvimento do filhote não está restrita apenas aos roedores. Em humanos, o período pós-parto é um período vulnerável e frequentemente associado ao aparecimento de depressão pós-parto sendo esse risco incrementado pela exposição a eventos estressantes durante a gestação (FEDERENKO; WADHWA, 2004). Além disso, alguns autores sugerem a existência de uma relação entre o estresse psicológico materno e o aumento, nos filhos, da incidência de sintomatologia de esquizofrenia e depressão (WATSON et al., 1999; GUTTELING et al., 2005). O estudo de Fries et al. (2005), com crianças criadas em orfanatos, indica que os sistemas de neuropeptídeos de vasopressina e de OT, os quais são críticos no estabelecimento de vínculos sociais e na regulação de comportamentos emocionais, são afetados pela experiência social precoce. Os níveis de OT em crianças criadas por uma família aumentam após contato físico com suas mães, enquanto que crianças as quais experienciaram negligência precoce não apresentam essa resposta após contato físico com suas mães. Por outro lado, um bom vínculo entre a mãe e a prole é associado melhor enfrentamento do estresse.

Assim, o ambiente materno constitui um dos mais significativos ambientes que um mamífero encontrará ao longo de toda a sua vida (PRYCE; BETTSCHEN; FELDON, 2003). Alteração no comportamento materno pode, portanto, influenciar nas respostas comportamentais e neuroendócrinas dos filhotes desde o nascimento até a fase adulta; o que torna esse comportamento crucial para o desenvolvimento adequado dos filhotes. Desta forma, alterações precoces neste ambiente podem levar à futuras alterações neuroendócrinas, desequilíbrio das funções cognitivas e na reatividade ao estresse, bem como no comportamento social/reprodutivo (MEANEY, 2001).

1.2 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

A teoria da programação metabólica se refere a um fenômeno epigenético pelo qual alterações no padrão nutricional, hormonal ou ambiental durante um período crítico da vida influenciam o desenvolvimento do organismo (MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008). Os mecanismos pelos quais estas alterações são capazes de afetar os sistemas fisiológicos que controlam o apetite, regulação do peso corporal e a etiologia das desordens metabólicas ainda não estão totalmente elucidados, porém algumas evidências sugerem que estas desordens manifestadas na vida adulta podem ter suas raízes antes do nascimento (BREIER et al., 2001).

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais apontam a relação entre a influência de fatores nutricionais (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976; STANNER, 1997; RODRIGUES et al., 2011; TROINA et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2009; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000; SYMONDS et al., 2009), hormonais (DE OLIVEIRA CRAVO et al., 2002; YURA et al., 2005; VICKERS et al., 2008; TREVENZOLI et al., 2010a; 2010b; BONOMO et al., 2005; TOSTE et al., 2006) e ambientais (YOUNG, 2000; DUTRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS-SILVA et al., 2010) na gestação e/ou lactação e a suscetibilidade ao desenvolvimento da obesidade na puberdade e idade adulta.

As pesquisas sobre como os padrões de crescimento dos indivíduos no início da vida atuam sobre a saúde, incluindo obesidade e doenças cardiovasculares têm aumentado rapidamente nos últimos 15 anos (CHOMTHO et al., 2008). A nutrição

adequada durante os períodos cruciais de desenvolvimento é essencial para o crescimento sadio, podendo agir como um fator de *imprinting*, programando futuras respostas fisiológicas (RAVELLI et al., 1976).

A fase do desenvolvimento em que tais influências ocorrem é de extrema importância, pois são em janelas específicas que são definidos padrões epigenéticos de expressão gênica, que em sua maioria poderão permanecer por toda vida (DIETZ, 1994; GLUCKMAN; HANSON, 2004; THOMPSON, 2007; DE MOURA et al., 2008; STRAUSSMAN et al., 2009; PLAGEMANN et al., 2010). A princípio, alterações metabólicas tornariam o indivíduo melhor adaptado à determinada condição desfavorável a que foi exposto no início da vida. No entanto, caso o indivíduo seja exposto a um ambiente com melhores condições, ele estará mais suscetível ao desenvolvimento de doenças (BARKER, 2004; DE MOURA et al., 2008). A este fenômeno foi atribuído o nome de programação metabólica (LUCAS, 1991; BARKER, 2004) ou mais recentemente plasticidade ontogenética (GLUCKMAN; HANSON, 2004), por sua característica mais probabilística do que determinística.

1.2.1 Modelo de programação pela superalimentação pós-natal

Diversos estudos experimentais utilizam a superalimentação neonatal como modelo experimental de obesidade (PLAGEMANN et al., 1999a; BOULLU-CIOCCA et al., 2005; MARTINS et al., 2008; PLAGEMANN et al., 2010; CONCEIÇÃO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; SOARES et al., 2012). A superalimentação (SA) neonatal induzida pela redução do tamanho da ninhada resulta em obesidade da prole lactente devido à menor concorrência entre os filhotes pelo leite materno e elevação do conteúdo de triglicérido no leite (VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2008; MOREIRA et al., 2009; CUNHA et al., 2009).

A obesidade neonatal causada pela SA resulta em hiperfagia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, resistência hipotalâmica à insulina e à leptina e maior adiposidade visceral já ao desmame (RODRIGUES et al., 2011; PLAGEMANN et al., 2010; CONCEIÇÃO et al., 2011). Durante a lactação, estruturas hipotalâmicas que possuem importantes funções na modulação do consumo alimentar e gasto energético encontram-se em formação e são altamente vulneráveis à ação de

hormônios neurotróficos, que podem conduzir à persistente desorganização estrutural e consequente disfunção (PLAGEMANN et al., 1999a; 1999b; BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004; PINTO et al., 2004; BOURET; SIMERLY, 2006; BOURET et al., 2010). Esse desbalanço do controle alimentar hipotalâmico é caracterizado pela redução do efeito inibitório da leptina sobre neurônios relacionados à regulação do apetite no núcleo hipotalâmico arqueado dos ratos adultos jovens (aos 50 dias) (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; 2001). Adicionalmente os neurônios do núcleo ventromedial apresentam resposta alterada aos peptídeos orexígenos NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (*agouti-related protein*) e aos anorexígenos α -MSH (hormônio estimulador de α -melanócitos) e o CART (*cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide*) (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002; 2003; LI; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 2002), além de uma inesperada redução na expressão hipotalâmica de RNAm de NPY aos 133 dias (FERRETTI et al., 2011) e na expressão de proteína aos 180 dias (RODRIGUES et al., 2011).

Além da resistência hipotalâmica à leptina, os animais submetidos à SA neonatal apresentam menor sensibilidade à insulina no tecido adiposo epididimal aos 90 dias (RODRIGUES et al., 2007) e no coração aos 140 dias (MARTINS et al., 2008). Adicionalmente, apresentam hipermetilação da região promotora do gene do receptor de insulina no hipotálamo, refletindo em menor expressão e consequente resistência insulínica (RI) aos 21 dias (PLAGEMANN et al., 2010). Apesar da menor sensibilidade em alguns tecidos, a SA neonatal resulta em hiperinsulinemia e aumento da sensibilidade à insulina no coração ao desmame (PEREIRA et al., 2006) e nas células- β pancreáticas aos 360 dias (CUNHA et al., 2009).

No modelo SA também é descrita a menor sensibilidade central a leptina, aos 180 dias, caracterizado pela redução do conteúdo hipotalâmico de JAK2 (janus cinase 2) e STAT3 (sinal transdutor e activador da transcrição 3) fosforilada, que são proteínas da via principal de sinalização da leptina e aumento do conteúdo de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), que é uma proteína estimulada pela leptina, mas que inibe a sinalização deste hormônio, através da desfosforilação do ObR (receptor de leptina) e da JAK2 (RODRIGUES et al., 2011). A leptina é uma adipocina que promove inibição dos neurônios orexígenos produtores de NPY/AgRP e ativação dos neurônios anorexígenos produtores de α -MSH/CART do núcleo hipotalâmico arqueado, consequentemente causando a ativação dos neurônios do

núcleo paraventricular produtores de CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e TRH (hormônio liberador de tireotrofina) (PEKARY; SATTIN; BLOOD, 2010). Este hormônio tem como principais funções inibir a ingestão alimentar (CUMMINGS et al., 2004) e aumentar o gasto energético. Em outras palavras, a leptina reduz o apetite ao informar o cérebro que os estoques de energia em forma de gordura estão adequados através da inibição da formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite. (VILLANUEVA; MYERS JR., 2008).

Roedores submetidos ao modelo SA apresentam obesidade associada à hipertensão arterial aos 112 dias (MORRIS, 2008). Alguns autores atribuem a causa da hipertensão arterial ao aumento da leptinemia, uma vez que é descrito que somente a administração intracerebroventricular de leptina é capaz de elevar tanto a liberação de catecolaminas adrenais quanto o tônus vasomotor (MARSH et al., 2003). A própria redução de NPY apresentada por animais SA aos 180 dias (RODRIGUES et al., 2011) também está associada ao aumento da atividade simpática, resultando em elevação dos níveis pressóricos (EGAWA; YOSHIMATSU; BRAY, 1991). Diferentes estudos consideram também a participação de parâmetros alterados pela obesidade na gênese de doenças cardiovasculares, como por exemplo: a hiperatividade do sistema simpatoadrenal e do sistema renina-angiotensina, a ausência de resposta a agentes vasodilatadores, a hipersensibilidade a vasoconstrictores, o estado pró-inflamatório sistêmico, a hiperinsulinemia e a hiperleptinemia (HALL; HILDEBRANDT; VERGELY, 2001; POIRIER et al., 2006). Embora muitos estudos tenham sido feito sobre as consequências cardio-metabólicas de camundongos geneticamente db / db ou ob / ob obesos ou de dietas ricas em gordura, pouco se sabe sobre as consequências cardiovasculares do sobrepeso moderado (HABBOUT et al., 2013), principalmente na fase adulta jovem.

Neste contexto, roedores criados em ninhadas pequenas têm demonstrado ser um modelo experimental útil para estudar as consequências de supernutrição precoce (HABBOUT et al., 2013). Distúrbios ocasionados pela ingestão excessiva de alimentos podem levar ao desenvolvimento de modificações a curto e longo prazo, não só no peso corporal e na ingestão de alimentos, mas também em várias características bioquímicas e metabólicas (PLAGEMMANN et al., 1999a; 1999b; WATERLAND; GARZA, 1999).

1.3 OBESIDADE

O avanço da obesidade é um fenômeno mundial que está afetando todos os indivíduos, independente de gênero, raça, idade e classe social. Segundo o banco de dados da Organização Mundial da Saúde, 1,5 bilhão de adultos estão acima do peso e, entre eles, 500 milhões são obesos (WHO, 2012a). Segundo dados recentes fornecidos pelo IBGE, o Brasil apresenta 64% da sua população com excesso de peso, sendo que destes 49% apresentam sobrepeso e 15% são obesos (IBGE, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde para 2015 a estimativa é de que pelo menos 700 milhões de pessoas estarão obesas. Projeta-se que, em 2020, cerca de $\frac{3}{4}$ das causas de mortalidade no mundo estejam associadas à obesidade e às suas repercussões (WHO, 2012b).

A excessiva ingestão alimentar pode ser considerada um fator fundamental para a etiologia da obesidade, uma vez que o balanço energético positivo tem extrema importância no desenvolvimento dessa doença (DÂMASO et al., 2003). Uma condição importante para o desenvolvimento da obesidade é a interação entre uma série de fatores tais como os genéticos, comportamentais, fisiológicos e psicológicos (GUEDES, 2007). Mudanças ambientais – físicas, socioculturais, econômicas e políticas – também desempenham papéis cruciais na epidemia da obesidade. Fatores genéticos, idade e efeitos hormonais influenciariam a susceptibilidade de cada indivíduo ao ganho ou perda de peso dentro de cada ambiente (CATERSON; GILL, 2002).

Além disso, a regulação da homeostase energética passa pelo controle do cérebro. Circuitos neurais do Sistema Nervoso Central, principalmente aqueles localizados no hipotálamo, constantemente recebem e integram sinais metabólicos, endócrinos e neurais coordenando respostas através do metabolismo de controle do peso corporal (LEIBOWITZ; WORTLEY, 2004).

Entre as diversas regiões cerebrais envolvidas no controle do peso corporal se destacam áreas hipotalâmicas. As ações efetoras hipotalâmicas responsáveis pelo controle da homeostase energética ocorrem via Sistema Nervoso Autônomo (SNA), o qual é composto pelo Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) e Sistema Nervoso Simpático (SNS). Frequentemente a ativação do SNP é responsável por eventos anabólicos, enquanto o SNS antagonicamente desencadeia ações

catabólicas, o que mostra a importância dos ramos autonômicos para o equilíbrio energético. Dados da literatura indicam que independente da origem da obesidade a subdivisão parassimpática se encontra em alta atividade, enquanto o SNS se encontra em baixa atividade. O desequilíbrio autonômico favorece o armazenamento e sinergicamente diminui o gasto energético tornando-se um forte determinante na instalação e/ou no desenvolvimento da obesidade (LEIBOWITZ; WORTLEY, 2004).

Até o presente momento, ainda não se conhecem precisamente todos os mecanismos que induzem a obesidade, todavia há um senso comum de que o padrão genético, hábitos alimentares e vida sedentária, em conjunto ou separadamente são candidatos frequentes nos estudos apresentados pela literatura (LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007; STOLAR, 2007).

Com raízes na infância, a obesidade ao longo dos anos é acompanhada de substanciais co-morbidades, a exemplo da hipertensão arterial, da intolerância à glicose, das alterações no metabolismo do colesterol, da síndrome metabólica, dos problemas ortopédicos, respiratórios e importantes disfunções psicossociais, que tendem a se agravar na vida adulta (ALVES et al., 2004). Quanto mais precoce é o aparecimento da obesidade, mais graves são as comorbidades desenvolvidas e associadas. Apesar disso, existe a possibilidade de um tratamento bem sucedido, quando iniciado em idade mais precoce (FREEDMAN et al., 1999; SICHIERI; SIQUEIRA; MOURA, 2000; PREIS et al., 2010), o que evidencia a importância da prevenção e do controle.

Diante do apresentado, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da programação metabólica por redução de ninhada na interação mãe-filhote e nas respostas comportamentais e endócrinas dos filhotes na fase adulta, uma vez que o ambiente materno constitui um dos mais importantes ambientes que o roedor encontrará ao longo de toda a sua vida.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem os seguintes objetivos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da redução de ninhada sobre o comportamento materno de ratas lactantes e possíveis consequências nas respostas endócrinas e comportamentais dos filhotes durante a fase adulta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da redução de ninhada no comportamento materno em ratas lactantes;
- Avaliar se a redução de ninhada influencia a ingestão e ganho de peso dos filhotes da lactação à fase adulta;
- Avaliar as alterações na variação de gordura corporal, nos níveis bioquímicos e hormonais de filhotes provindos de ninhada normal e reduzida na fase adulta;
- Avaliar as respostas comportamentais dos filhotes na fase adulta, provenientes de ninhada normal e reduzida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais descritos abaixo aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas - MG (Protocolo nº. 445/2012).

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* pesando entre 180 a 220g, a partir de 8 semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção (39 x 31 x 17 cm³), tratadas com ração comercial e água “*ad libitum*” e mantidas em sala climatizada a 22 ± 2 °C em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas as 7:00h). Foram também utilizados machos (pesando entre 270 a 300g) da mesma linhagem para o acasalamento e para a avaliação do comportamento agressivo, mantidos sob as mesmas condições.

3.2 ACASALAMENTO

Ao final do dia, ratas que se encontravam no período de transição da fase proestro para o estro foram colocadas na gaiola com rato sexualmente experiente para o acasalamento na proporção de três fêmeas para um macho. No início do período claro do dia seguinte, foi realizada a citologia vaginal para confirmar a presença de espermatozóides, sendo este considerado o dia primeiro de prenhez. As ratas prenhes foram alocadas individualmente em uma caixa até o nascimento dos filhotes.

3.3 PADRONIZAÇÃO DE NINHADAS

No segundo dia de lactação, as ninhadas foram randomizadas em grupo de ninhada reduzida (NR) e grupo controle (NN). Para reduzir a interferência no cuidado materno, nenhuma manipulação foi realizada no primeiro dia pós-parto. No 2º dia de vida as ninhadas NR foram reduzidas para 3 filhotes (2 filhotes machos por ninhada) e as ninhadas NN foram padronizadas com 12 filhotes (máximo 6 filhotes machos por ninhada) (VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2005; RAJIA; CHEN; MORRIS, 2010). A definição do modelo se deu mediante escolha dos dois pontos extremos de cada grupo (NN e NR) já aceitos pela literatura, que caracterizam ninhada reduzida por 3-4 filhotes e grupo controle por 10-12 filhotes (HABBOUT et al. 2013), respeitando a proporcionalidade entre machos e fêmeas.

3.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS LACTANTES

O comportamento materno de ratas lactante foi avaliado a partir de três parâmetros: cuidado materno, ansiólise maternal e comportamento agressivo.

3.4.1 Avaliação do cuidado materno

Para o registro do cuidado materno, as ratas (NR, n=8; NN, n=8) foram transferidas para caixas de acrílico transparentes (40 x 33 x 25 cm³) com maravalha servindo de substrato, 5 dias antes do parto, acondicionadas em gabinetes ventilados. Do 2º ao 21º dia de lactação (DL) foi realizado o registro diário de cada rata lactante durante 4 períodos. Cada sessão consistiu de 72 min de observação em horários regulares pré-estabelecidos, sendo 3 períodos durante a fase clara (8:00, 12:00 e 16:00h) e 1 período durante a fase escura (20:00h) do ciclo claro-escuro (CHAMPAGNE et al., 2003). Em cada sessão, o comportamento das ratas lactantes foi registrado a cada 3 min (25 observações por período x 4 períodos por dia = 100

observações/rata/dia) (CHAMPAGNE et al., 2003; CALDJI et al., 1998). Os seguintes comportamentos foram registrados:

- Rata alimentando;
- Rata sem filhotes: quando a rata estiver fora do ninho e sem contato com os filhotes;
- Rata lambendo os filhotes;
- Rata sobre os filhotes em posição não arqueada;
- Rata sobre os filhotes em posição arqueada (cifose fisiológica);
- Rata em posição passiva: deitada de costas ou de lado;
- Rata construindo o ninho: quando a rata recolhe maravalha com a boca ou empura para o ninho;
- Rata em *self-grooming* (auto-limpeza)
- Cuidado materno total (CDMT): somatório dos parâmetros maternos: lambida, cifose, sobre os filhotes, posição passiva e construindo ninho;
- Cuidado não materno total (CDñMT): somatório dos parâmetros não maternos: alimentando, explorando, não explorando, *self-grooming*.

3.4.2 Avaliação da ansiólise maternal

As fêmeas em lactação (NR, n=8; NN, n=8) foram testadas no labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de campo aberto (CA) no 6º dia de lactação, entre o período de 8 às 10h. Os animais foram ambientados à sala de experimento, por 30 minutos antes do teste. Os mesmos experimentos foram repetidos, com os outros grupos de fêmeas lactantes no 13º e 20º dia de lactação.

3.4.2.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um método bem conhecido e preditivo para drogas ansiolíticas ou ansiogênicas (FILE, 2001) e foi usado para mensurar a ansiedade nesse estudo. O LCE consiste em um aparato suspenso do chão, com

dois braços abertos, dois braços fechados e uma plataforma central suspenso do chão. No momento do teste, os animais foram colocados no centro de frente para um dos braços fechados e filmados durante cinco minutos consecutivos, na ausência do experimentador. As medidas comportamentais registradas foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) são preditores de ansiedade reduzida (FILE; MABBUTTI; HITCHCOTT, 1990, CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

3.4.2.2 Campo aberto

Imediatamente após o teste do labirinto em cruz elevado, os animais foram colocados individualmente em uma arena circular de acrílico com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes, dos quais 8 áreas junto às paredes do aparato são considerados periféricas e as 4 demais centrais. Cada animal foi colocado no centro da arena e filmado por cinco minutos, na ausência do experimentador, para posterior análise. Foi registrado o número de cruzamentos com as quatro patas no centro, na periferia e o efeito anti-tigmotático (número de entradas no centro/número total de entradas). A preferência pela área periférica é conhecida como tigmotaxia e uma diminuição dessa preferência é denominado efeito anti-tigmotático, que referido como medida de ansiedade reduzida (VALLE, 1970). Este teste também foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais, considerando-se o número de entradas com as quatro patas na periferia e o total de cruzamentos. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

3.4.3 Avaliação do comportamento agressivo

Para o início do teste, um rato adulto macho jovem (60 dias), denominado intruso) foi colocado na caixa-moradia onde estava a rata com sua ninhada para o início do teste que teve duração de 10 minutos. O macho foi colocado do lado oposto à localização do ninho. A filmagem do teste foi realizada na ausência do experimentador. Foram avaliados os seguintes parâmetros de acordo com alguns estudos (CONSIGLIO et al., 2005; VEIGA et al., 2007; CONSIGLIO; BRIDGES, 2009):

- 1- Latência em segundos para o primeiro ataque;
- 2- Número de ataques frontais (direcionados à cabeça do animal);
- 3- Número de ataques laterais (direcionados ao corpo do animal);
- 4- Número de ameaças laterais;
- 5- Tempo de expressão do cuidado materno (rata sobre os filhotes, lambe os filhotes).

As ratas foram avaliadas no 7º, 14º e 21º DL (NR, n=8; NN, n=8).

3.5 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA

O peso da ninhada (NR, n=8; NN, n=8) foi registrado a partir do 2º dia e a cada 3 dias de lactação. Foram então 7 registros de peso da ninhada, sendo no 2º, 5º, 8º, 11º, 14º, 17º e 20º dia de lactação.

Após o desmame (realizado aos 21 dias de vida) o peso de cada animal foi avaliado semanalmente até a 8ª semana de vida.

3.6 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR DOS FILHOTES

A medida de ingestão alimentar foi realizada, uma vez por semana, da 4ª a 8ª semana, quando os animais (NR, n=8; NN, n=8) eram alocados individualmente em

gaiolas metabólicas, sob temperatura e umidade controladas. O teste iniciou-se com a ambientação dos animais nas gaiolas por um período de 15h (17h às 08h) e só então foi iniciada a mensuração da ingestão hídrica e alimentar (ração padrão) dos animais por um período de 24 horas. A quantidade de ração e água disponibilizada em cada gaiola foi previamente pesada e medida. Antes e após ser colocado na gaiola o animal teve seu peso aferido para análise. Após esse período, o animal foi retornado à sua caixa moradia.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE NA FASE ADULTA

A caracterização da obesidade dos animais provenientes de ninhada reduzida e ninhada normal se deu com base na avaliação do Índice de Lee (n=16), quantificação da adiposidade abdominal (n=16) e avaliação do perfil bioquímico (n=8), aos 60 dias de idade.

3.7.1 Índice de Lee

O peso e o comprimento nasoanal (CNA) dos animais foram registrados para o cálculo do índice de Lee, que é a relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal [$\sqrt[3]{\text{Peso (g)}/\text{CNA(cm)}}$] (DE MOURA et al., 2009).

3.7.2 Quantificação da adiposidade abdominal

A quantificação da adiposidade abdominal foi feita após o morte do animal por anestésico inalante, por meio de dissecação dos depósitos de gordura peri-gonadal e retroperitoneal que foram imediatamente pesados. O resultado foi expresso em g/100g de peso corporal (FERNANDEZ et al., 2009).

3.7.3 Dosagens bioquímicas

Após jejum prévio de 12h (HOU et al.; 2011), os animais foram decapitados, o sangue coletado do tronco encefálico (5 mL) em tubos plásticos contendo heparina e mantidos sob gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento das dosagens bioquímicas (máximo 7 dias após a coleta). Com essas amostras foram realizadas as análises de glicose, triglicérides, colesterol total e colesterol HDL através de kits *Labtest*[®]. LDL-c e VLDL-c foram obtidos por cálculos de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972):

$$1) \text{ LDL-c (mg/dL) = colesterol total - (HDL-c + VLDL-c)}$$

$$2) \text{ VLDL-c (mg/dL) = Triglicerídeos/5}$$

3.8 DOSAGEM HORMONAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA

Após realização dos devidos testes e jejum prévio de 8-10h, os animais (NR, n=8; NN, n=8) foram decapitados, o sangue coletado do tronco (5 mL) em tubos plásticos contendo heparina e mantidos sob gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento das dosagens hormonais, que foram realizadas em um único ensaio. Com essas amostras foram realizadas as análises de adiponectina, leptina e insulina pelo método de Elisa (*Enzo Life Sciences*[®]). O limite de sensibilidade e intra-ensaio variação foram de 0,5 ng / ml e 6,9%, respectivamente. A insulina no plasma foi determinada com uma sensibilidade do ensaio de 0,1 ng / ml e uma variação intra-ensaio de 4,1%. Leptina e Adiponectina total foi medida com uma sensibilidade do ensaio de 0,5 ng / ml e uma variação intra-ensaios de 7,1% (RODRIGUES et. al., 2011).

3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA (K_{ITT})

Decorridos 60 dias, os animais (NR, n=8; NN, n=8) foram submetidos à avaliação da secreção e da ação periférica da insulina através do teste de tolerância oral à glicose (GTT_o) e teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT_i). Ambos os testes foram realizados após jejum de 8-10 horas (ITT_i) ou 12h (GTT_o) e canulação prévia da veia jugular para coleta do sangue.

Nesse experimento, o GTT_o foi realizado através da administração oral de solução de glicose 30% (2.5 g/Kg de p.c.) com coletas de plasma antes e após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração da glicose. A avaliação das respostas glicêmicas durante o teste foi efetuada através do cálculo da área sob a curva (AUC=nM.min) (KITAGAWA et al., 2011).

Para a realização do ITT_i, foi injetado via intraperitoneal 1,5UI/kg de massa corporal de insulina regular da marca Insunorm R[®]. A glicemia foi mensurada antes da aplicação da insulina e nos tempos 4, 8, 12, 16 minutos. A taxa de decaimento da glicose (K_{ITT}) foi calculada utilizando-se o *software Prisma 3.0* e expressa em %/minuto.

A quantificação da resistência à insulina se deu pelo modelo homeostático de avaliação (HOMA), calculado utilizando-se a seguinte fórmula: $HOMA = \text{Glicemia em jejum (mMol)} \times \text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) / 22,5$ (MATTHEWS et al., 1985). O índice triacilglicerídeos/ glicose (TyG), um método recentemente validado para determinar a resistência à insulina (GUERRERO-ROMERO et al., 2010), foi calculado com base na seguinte fórmula: $\text{Ln} [\text{triacilgliceridemia de jejum (mg dL}^{-1}) \times \text{glicemia de jejum (mg dL}^{-1}) / 2]$.

Todas as amostras obtidas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a -4°C, 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi pipetado e em seguida foram realizadas as dosagens de glicose. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase, com *kit Labtest*. As absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 500nm.

3.10 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA

Os filhotes das ratas (NR, n=8; NN, n=8) que foram utilizadas para registro do comportamento materno foram desmamados no 21^o dia de lactação e separados em machos e fêmeas em caixas na 5^a semana até a realização dos experimentos que foram realizados na 9^o semana de idade.

Os testes comportamentais realizados foram o de labirinto em cruz elevado, campo aberto (anteriormente descritos) e o de medo condicionado ao contexto.

3.10.1 Medo condicionado ao contexto

A caixa de condicionamento consiste de uma caixa com uma das paredes de acrílico e as demais foscas (25x22x22 cm³) e assoalho gradeado (18 barras de aço inoxidável de 2mm de diâmetro espalhadas a 1,5 cm entre si) que permite a passagem de uma corrente elétrica para administração de um choque elétrico. O choque atinge o animal nas patas e causa elevação da ansiedade e condicionamento de medo ao contexto.

O teste foi conduzido durante 3 dias. No primeiro dia, denominado ambientação, o animal foi introduzido na caixa-teste, onde permaneceu por um período de 10 minutos; sem receber nenhum estímulo de choque. No segundo dia, denominado condicionamento, os animais foram divididos em 2 grupos: um condicionado e outro não-condicionado. O animal do grupo condicionado foi colocado na caixa-teste por 10 minutos e após 4 minutos de ambientação recebeu 6 sessões de choque nas patas (1500 mA, 3 s) com intervalos entre eles de 20s a 1 min. Os animais do grupo não condicionado foram colocados na caixa-teste e não receberam nenhum estímulo de choque. No terceiro dia, os animais foram novamente colocados na caixa-teste por 10 minutos, não receberam nenhum estímulo de choque e tiveram o tempo de *freezing* avaliado, que é definido como ausência de qualquer movimento motor corporal, exceto o respiratório (adaptado de LISBOA et al., 2010). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando um *software* GraphPad versão 3.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação de duas médias foi aplicado o teste “t” de *Student*. Para comparação de três ou mais médias foi utilizado a análise de variância (ANOVA *two-way*) seguida pelo pós-teste de *Bonferroni* ou análise de variância (ANOVA *one-way*) seguida pelo pós-teste *Newman-Keuls*, conforme necessário. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO EM RATAS LACTANTES

4.1.1 Cuidado materno

A Figura 1 mostra o efeito da redução ninhada sobre o cuidado materno total (CDMT) e cuidado não materno total (CDñMT) desde 2º até o 21º DL. Os dados foram obtidos a partir da média diária das observações para cada parâmetro avaliado.

A análise através da ANOVA *two-way* mostrou que há efeitos significativos no fator redução de ninhada (RN) e dia de lactação (DL) e ainda na interação entre os dois fatores quando analisada a porcentagem de observações do cuidado materno total (fator RN: $F_{1,280} = 133.6$, $p < 0.0001$; fator DL: $F_{19,280} = 15.90$, $p < 0.0001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 2.804$, $p < 0.0001$; Fig. 1A) e porcentagem de observações do cuidado não materno total (fator RN: $F_{1,280} = 137.9$, $p < 0.0001$; fator DL: $F_{19,280} = 16.45$, $p < 0.0001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 2.882$, $p < 0.0001$; Fig. 1B) em relação ao grupo de ninhada normal.

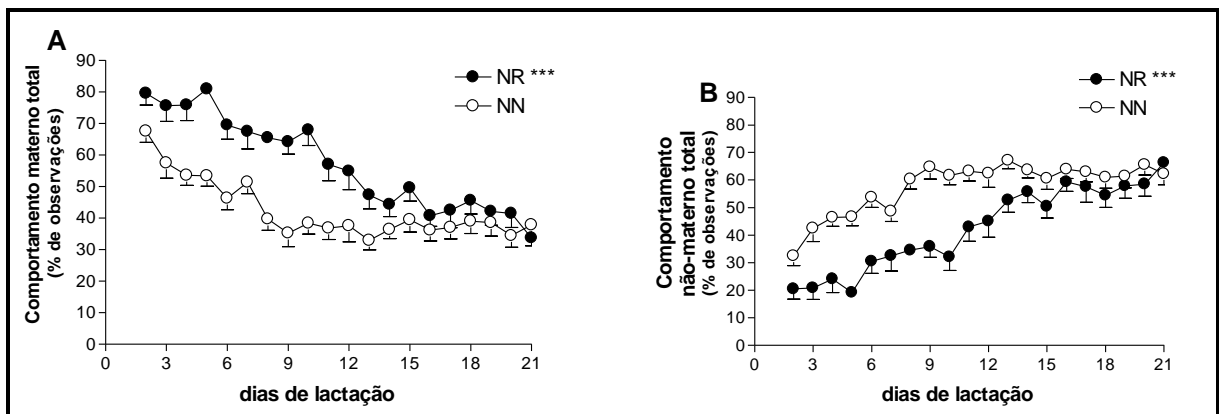


Figura 1. Avaliação do cuidado materno de ratas com ninhada reduzida (NR, n = 8) e com ninhada normal (NN, n = 8) durante os 20 dias de lactação. Cuidado Materno Total (A) e Cuidado Não Materno Total (B). Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0.0001$, quando comparado com ratas com ninhada normal (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

Fonte: Da autora.

Em relação aos parâmetros maternos houve diferenças no fator redução de ninhada, no fator dia de lactação e na interação entre os dois fatores na porcentagem de observações do comportamento de cifose (fator RN: $F_{1,280} = 129.1$, $p < 0.0001$; fator DL: $F_{19,280} = 19.51$, $p < 0.0001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 4.477$, $p < 0.0001$; Fig. 2A) e na porcentagem de observações de lambida nos filhotes (fator tratamento: $F_{1,280} = 213.7$, $p < 0.0001$; fator DL: $F_{19,280} = 2.073$, $p < 0.0001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 1.692$, $p < 0.0001$; Fig. 2B). Houve efeito no dia de lactação, mas não no fator redução de ninhada e na interação entre os dois fatores na porcentagem de observações de posicionamento sobre os filhotes (fator RN: $F_{1,280} = 3.311$, $p = 0.0699$; fator DL: $F_{19,280} = 1.762$, $p < 0.05$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 1.173$, $p = 0.2796$; Fig. 2C); na porcentagem de observações no comportamento passiva (fator RN: $F_{1,280} = 0.0502$, $p = 0.8191$; fator DL: $F_{19,280} = 2.217$, $p < 0.001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 0.9897$, $p = 0.4732$; Fig. 2D) e na porcentagem de observações de construção de ninho (fator RN: $F_{1,280} = 0.1190$, $p = 0.7304$; fator DL: $F_{19,280} = 3.557$, $p < 0.0001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 1.228$, $p = 0.2341$; Fig. 2E).

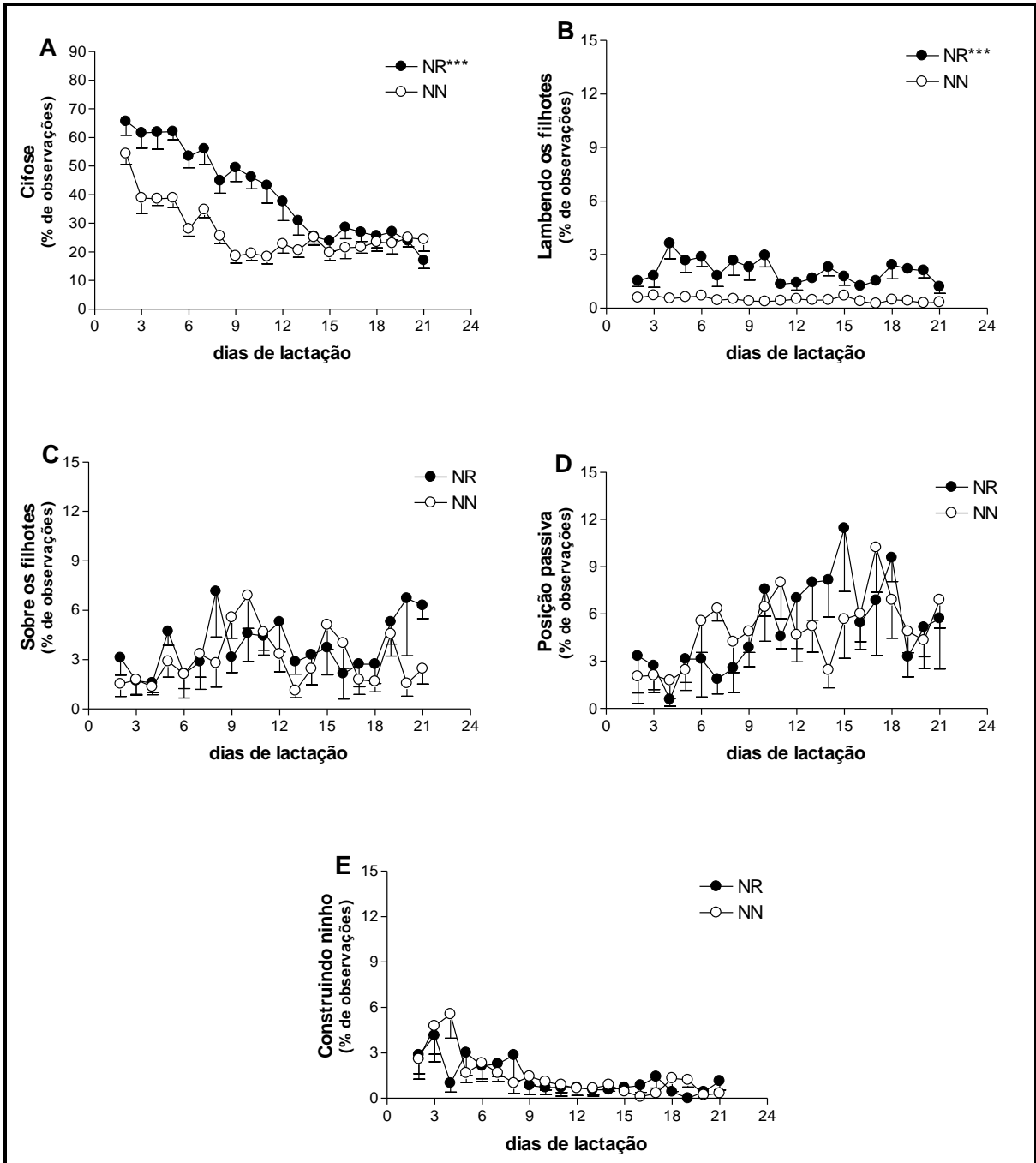


Figura 2. Avaliação dos parâmetros maternos de ratas com ninhada reduzida (NR, n = 8) e ninhada normal (NN, n = 8) durante os 20 dias de lactação. Cifose (A), Lambendo os Filhotes (B), Sobre os Filhotes (C), Passiva (D) e Construindo Ninho (E). Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0.0001$, quando comparado com ratas com ninhada normal (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

Fonte: Da autora.

O cuidado não materno também sofreu influência da redução da ninhada como mostrado na figura 3. Nos parâmetros não maternos, os fatores redução de ninhada e dia de lactação apresentaram diferenças, bem como a interação entre os

mesmos na porcentagem de observações do comportamento de não explorar (fator RN: $F_{1,280} = 38.02$, $p < 0.0001$; fator DL: $F_{19,280} = 12.75$, $p < 0.0001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 4.390$, $p < 0.0001$; Fig. 3C). Na porcentagem de observações do comportamento de alimentação houve diferença no fator RN e dia de lactação, entretanto a interação entre os dois fatores não foi significativa (fator RN: $F_{1,280} = 67.46$, $p < 0.0001$; fator DL: $F_{19,280} = 4.212$, $p < 0.0001$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 0.5275$, $p = 0.9493$; Fig. 3A). Já na porcentagem de observações do comportamento explorando houve efeito significativo apenas no fator RN (fator RN: $F_{1,280} = 14.13$, $p = 0.0002$; fator DL: $F_{19,280} = 0.9421$, $p = 0.5187$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 0.4788$, $p = 0.9696$; Fig. 3B). Na porcentagem de observações do comportamento de *self grooming* não houve diferença significativa no fator RN, mas sim no fator dia de lactação, sem ocorrer interação entre os mesmos (fator RN: $F_{1,280} = 2.850$, $p = 0.0925$; fator DL: $F_{19,280} = 2.691$, $p = 0.0002$; interação RN x DL: $F_{19,280} = 0.8468$, $p = 0.6497$; Fig. 3D).

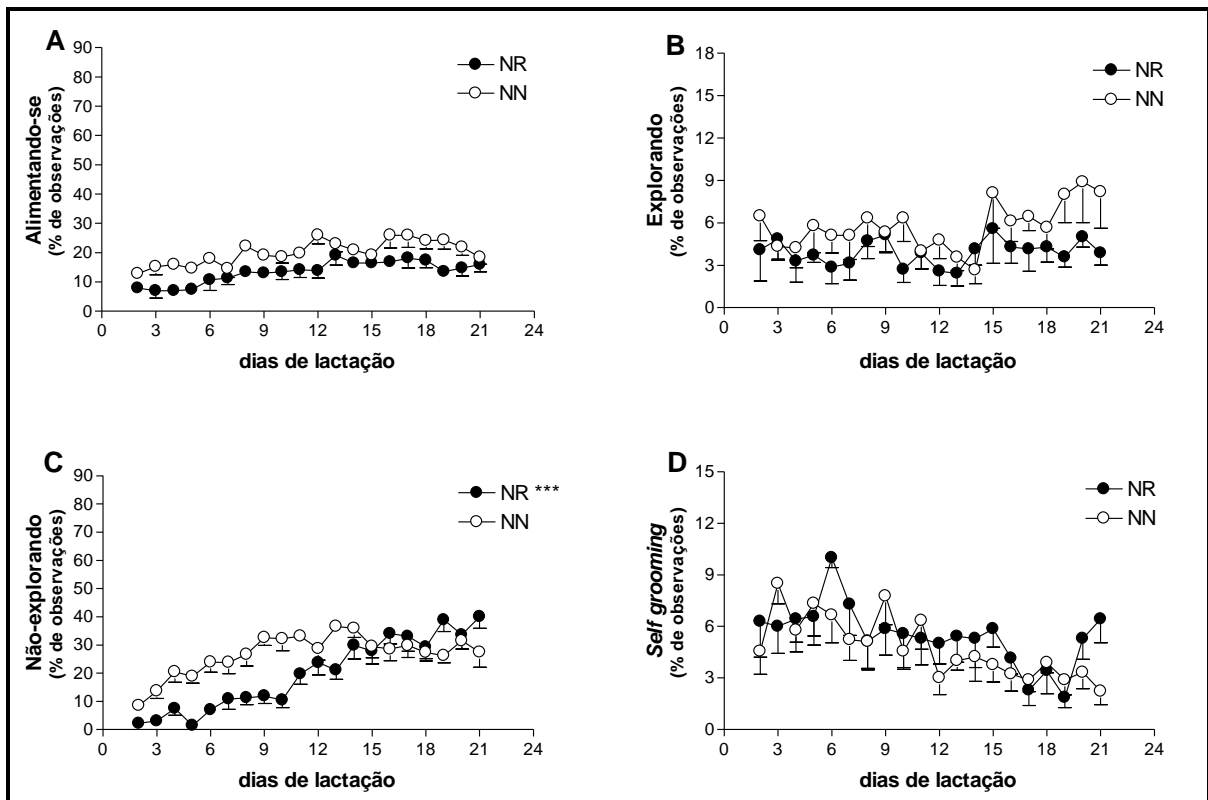


Figura 3. Avaliação dos parâmetros não-maternais de ratas com ninhada reduzida (NR, $n = 8$) e ninhada normal (NN, $n = 8$) durante os 20 dias de lactação. Alimentando (A), Explorando (B), Não-explorando (C), Auto-limpeza (*self grooming*) (D). Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0.0001$, quando comparado com ratas com ninhada normal (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

Fonte: Da autora.

Realizou-se a avaliação dos parâmetros maternos e não maternos a cada semana separadamente (2^o ao 7^o DL – primeira semana, 8^o ao 14^o DL – segunda semana e 15^o ao 21^o DL – terceira semana), a fim de se determinar como progride o cuidado materno de ratas lactantes e quais parâmetros são alterados a partir da redução de ninhada.

O CDMT foi maior em mães com ninhada reduzida considerando-se o total de observações das primeira e segunda semanas de lactação pelo Teste *t* de *Student* (75.37 ± 2.25 , na primeira semana e 56.31 ± 2.39 na segunda semana, $p < 0.0001$; Fig. 4A). De forma complementar o CDñMT foi menor nas ratas NR (24.26 ± 2.44 na primeira semana e 41.31 ± 2.71 na segunda semana; $p < 0.0001$; Fig. 4B) quando comparadas com mães com ninhada normal (51.72 ± 2.89 ; 35.51 ± 1.77 para CDMT; 46.08 ± 2.32 ; 62.70 ± 1.64 ; respectivamente). Na terceira semana de lactação não houve diferença significativa no total de observações do CDMT entre as mães com ninhada pequena (40.65 ± 2.87 , $p = 0.2230$; Fig. 4A) comparado com mães com ninhada grande (36.72 ± 1.57 , $p = 0.2330$). O mesmo ocorreu no CDñMT entre mães NR (58.69 ± 2.465 , $p = 0.487$; Fig. 4B) comparado com mães NN (61.25 ± 2.51).

Os resultados revelaram ainda que a redução de ninhada alterou a cifose, lambida, alimentação da mãe e o tempo que a rata passa longe dos filhotes durante as duas primeiras, de forma muito semelhante. Os parâmetros da cifose e lambida permaneceram aumentados em ratas com ninhada reduzida ($p < 0.0001$, TABELA 1), enquanto o tempo que essas mesmas ratas permaneceram alimentando-se ($p < 0.001$, TABELA 1) e longe dos filhotes ($p < 0.0001$, TABELA 1) diminuiu, quando comparadas com ratas com ninhada normal. Já na terceira semana apenas o parâmetro alimentando-se permaneceu diminuído em ratas NR ($p < 0.05$, TABELA 1) e a lambida aumentada ($p < 0.0001$, TABELA 1). A cifose e o parâmetro longe dos filhotes deixaram de apresentar diferenças significantes em ratas que sofreram redução de ninhada, quando comparadas com ratas com ninhada normal na terceira semana. O parâmetro *self-grooming* apresentou-se aumentado em ratas NR nesta semana ($p < 0.05$, TABELA 1).

Na terceira semana houve tanto aumento quanto diminuição de parâmetros não maternos (*self-grooming* e alimentando-se, respectivamente) em ratas NR.

Tabela 1. Parâmetros do cuidado materno em ratas lactantes com ninhada reduzida (NR, n = 8) e em ninhada normal (NN, n = 8). *, p < 0.05, **, p < 0.001, ***, p < 0.0001 quando comparadas à ratas lactantes com. Valores expressos como média ± EPM (Teste *t* de Student).

PARÂMETRO	SEMANA					
	2º - 7º DL		8º - 14º DL		15º - 21º DL	
	NN	NR	NN	NR	NN	NR
Alimentando-se	13.06±0.96	7.28±1.33**	21.97±1.34	14.67±1.22**	21.97±1.73	16.16±0.37
Explorando	4.42±0.75	3.17±0.45	4.60±0.89	3.67±0.68	8.11±0.83	4.40±0.83
Sem os filhotes	16.33±1.28	4.65±0.93***	31.44±1.15	18.74±2.32***	26.82±2.82	34.02±2.69
<i>Self grooming</i>	6.21±0.35	6.54±0.57	4.90±0.63	5.44±0.36	3.09±0.34	4.14±0.26
Lambendo	1.46±0.10	6.58±0.99***	1.31±0.12	5.67±0.60***	1.05±0.11	.30±0.43***
Cifose	32.77±1.65	50.53±2.81***	21.51±1.37	40.00±3.11***	22.57±2.10	24.61±2.15
Sobre os filhotes	1.86±0.38	2.17±0.44	3.63±0.58	4.65±0.84	2.93±0.53	4.10±0.51
Passiva	3.11±0.61	2.10±0.90	5.20±1.02	5.36±0.66	6.34±1.45	6.57±1.37
Construindo ninho	2.82±0.68	2.12±0.35	0.92±0.16	0.99±0.31	0.28±0.07	0.65±0.20
Cuidado materno total	51.72±2.89	75.37±2.25***	35.51±1.79	56.31±2.39***	36.72±1.57	40.65±2.87
Cuidado não materno total	46.08±2.32	24.26±2.44***	62.70±1.64	41.31±2.71***	61.25±2.51	58.69±2.46

Fonte: Da autora.

4.1.2 Ansiólise maternal

As Figuras 4 e 5 mostram os resultados dos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado (média ± EPM) no 6º, 13º e 20º DL em ratas com ninhada normal e ninhada reduzida. Como a lactação é um fenômeno que por si só ocasiona uma resposta reduzida à ansiedade (FERREIRA et al., 2002; NUMAN; 1994; FLEMING; WALSH, 1994), ambos grupos foram comparados à ratas não-lactantes, nos mesmos testes, a fim de determinar a ação da redução de ninhada *per se* sobre a ansiólise maternal, excluindo assim o viés da lactação.

Pôde-se notar então que, no teste de campo aberto, as ratas com ninhada reduzida apresentaram um maior número de cruzamentos centrais quando comparadas tanto à ratas não lactantes, quanto à ratas com ninhada normal (p < 0.05), no 6º dia de lactação. Nos demais dias avaliados não houve diferença significantes entre os grupos avaliados neste parâmetro.

No que se refere ao número de cruzamentos periféricos não observou-se nenhuma diferença entre os grupos no 6º DL. No entanto, no 13º e 20º DL as ratas com ninhada normal apresentaram um diminuição no número de cruzamentos

periféricos quando comparadas às ratas não lactantes ($p < 0.05$ e $p < 0.0001$, Fig. 8B, respectivamente), mas não às ratas com ninhada reduzida. Já as ratas NR apresentaram respostas diferentes apenas no 20º DL, com redução do número de cruzamentos periféricos quando comparadas às ratas não lactantes ($p < 0.001$, Fig. 8B).

A análise do número de cruzamentos totais, parâmetro que prediz a locomoção do animal, demonstrou que a redução de ninhada não alterou a resposta das ratas lactantes, em nenhum dos dias avaliados, quando estas foram comparadas com ratas lactantes com ninhada normal e ratas não lactantes. Porém, as ratas NN, apresentaram porém, diminuição no número de cruzamentos totais no 13º DL ($p < 0.05$, Fig. 4D), quando comparadas à ratas não lactantes.

O efeito anti-tigmotático, representado pela razão entre o número de cruzamentos centrais sobre o número total de cruzamentos, encontrou-se aumentado em ratas lactantes com ninhada reduzida em todos os momentos avaliados ($p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, respectivamente, Fig. 4E) quando comparadas com ratas não lactantes. Quando estas foram comparadas com ratas com ninhada normal, esse parâmetro aumentou apenas nos 6º e 13º DL ($p < 0.05$, Fig. 4E). Ratas com número normal de filhotes apresentaram aumento no efeito anti-tigmotático apenas no 20º DL ($p < 0.05$) quando comparadas com ratas não lactantes, porém não apresentaram diferença em relação às ratas NR.

Em relação ao número de *rearings*, não houve diferença estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados (Fig. 4C).

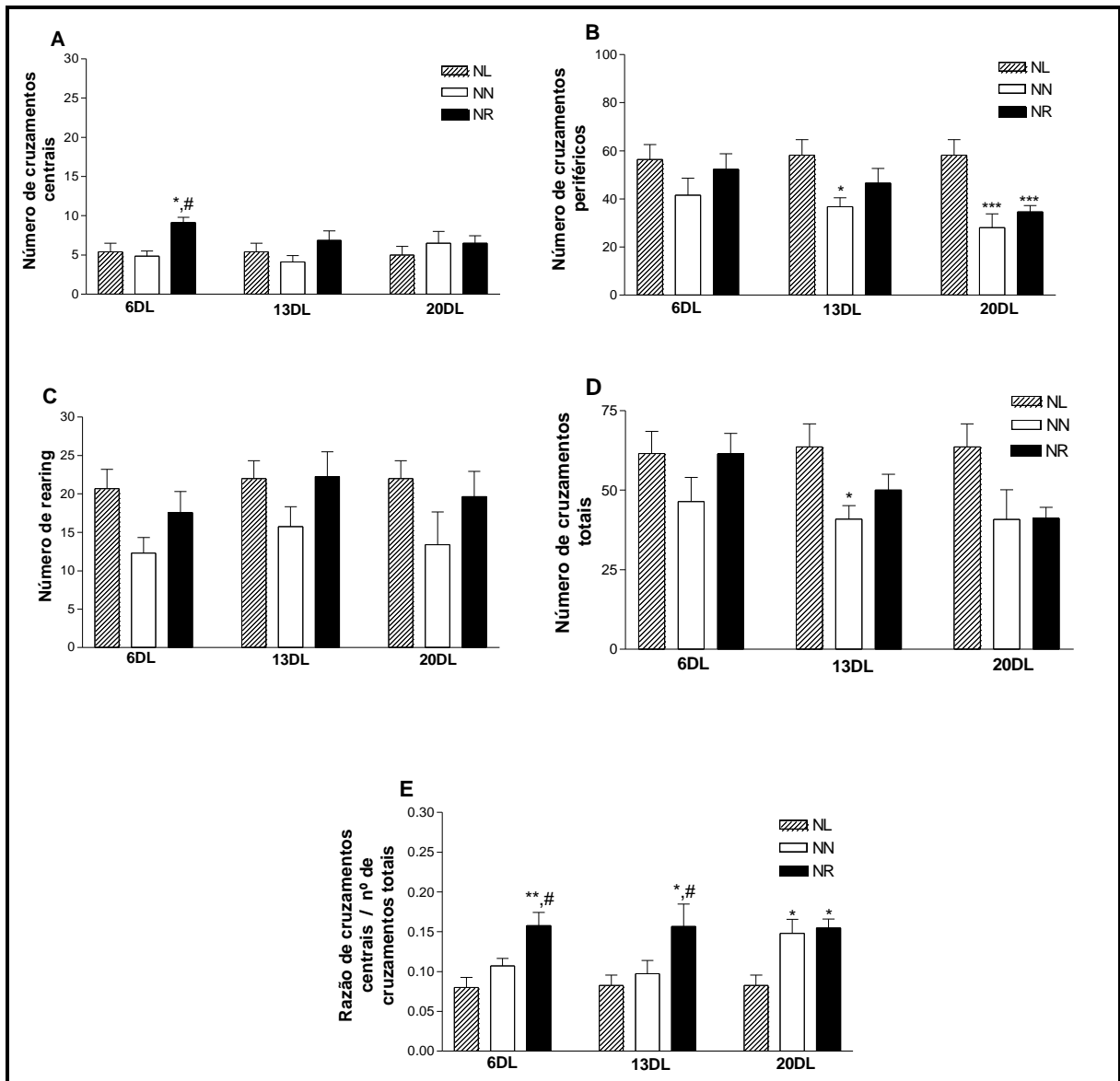


Figura 4. Teste de campo aberto em ratas não lactantes (NL, $n = 8$), ratas com ninhada normal (NN, $n = 8$) e ratas com ninhada reduzida (NR, $n = 8$) ao longo do período lactacional. A) Número de cruzamentos centrais, (B) Número de cruzamentos periféricos, (C) Número de *rearing*, (D) Número de cruzamentos totais, (E) Razão de número de cruzamentos centrais / nº de cruzamentos totais, DL: dia de lactação. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$, quando comparado com ratas NL. #, $p < 0.05$, quando comparado com ratas NN. Valores expressos como média \pm EPM (*One-way ANOVA* seguido do teste de *Newman-Keuls*).

Fonte: Da autora.

A avaliação dos animais no teste labirinto em cruz elevado demonstrou redução dos comportamentos relacionados à ansiedade (maior número de entradas / tempo nos braços aberto) em ratas lactantes com ninhada reduzida (Fig. 5).

Ratas NR apresentaram um aumento no número de entradas nos braços abertos no 6º e 20º DL ($p < 0.05$, Fig. 5A), maior tempo de permanência nos braços abertos no 20º DL ($p < 0.05$, Fig 5B), diminuição no número de entradas nos braços

fechados no 6º e 20º DL ($p < 0.05$, Fig 5C) e diminuição do número de entradas totais no 13º DL ($p < 0.05$, Fig 5D), quando comparadas às ratas não lactantes. Mães com ninhada normal apresentaram redução apenas no número de entradas totais no 13º DL ($p < 0.05$, Fig 5D). Mães NR não apresentaram diferenças em relação às mães NN em nenhum dos parâmetros avaliados no teste de labirinto em cruz elevado ao longo da lactação.

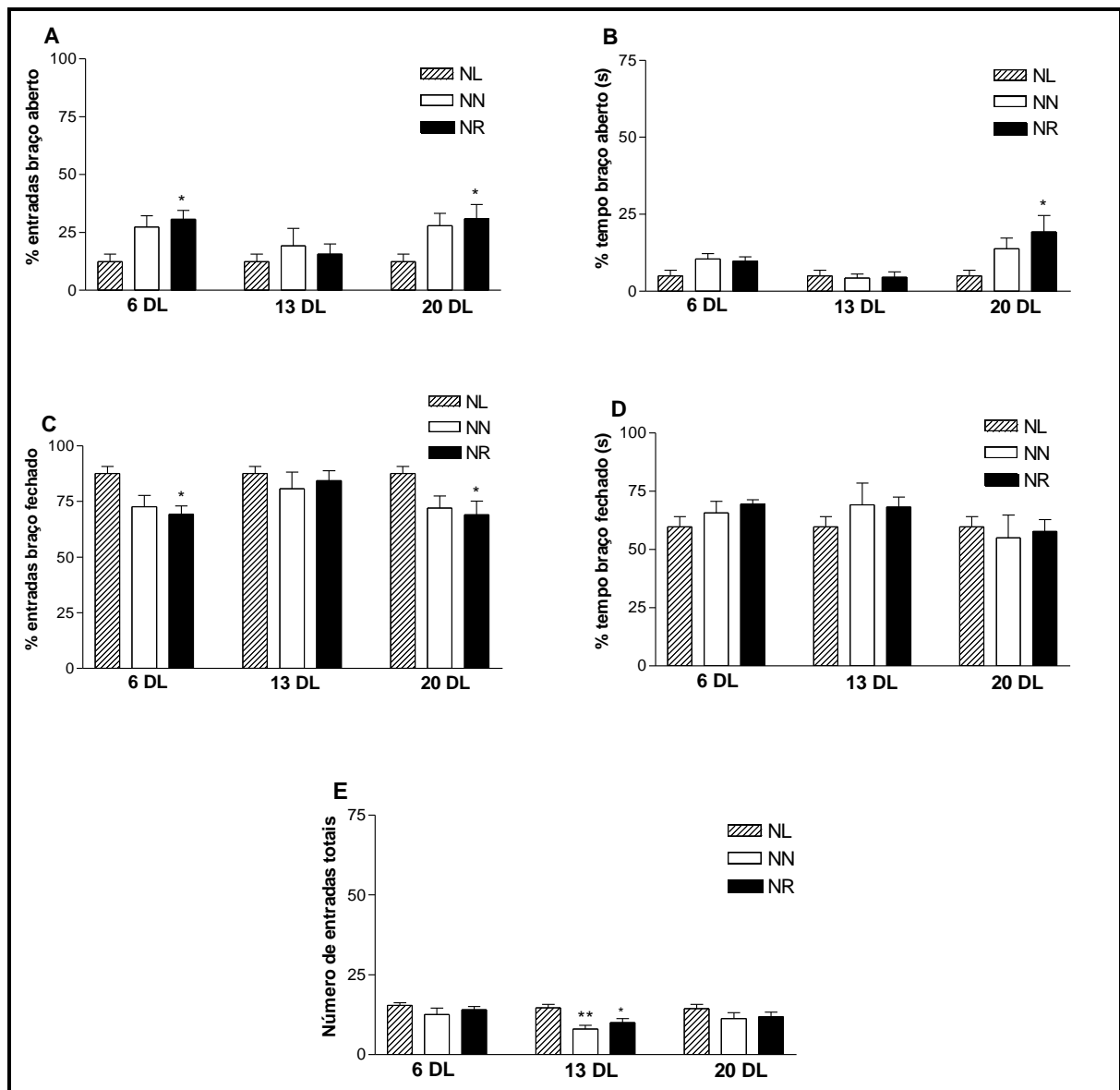


Figura 5. Teste de labirinto em cruz elevado de ratas não lactantes (NL, $n = 8$), ratas com ninhada normal (NN, $n = 8$) e ratas com ninhada reduzida (NR, $n = 8$) ao longo do período lactacional. (A) % Número de entradas nos braços abertos, (B) % tempo nos braços abertos, (C) % número de entradas nos braços fechados, (D) % tempo nos braços fechados, (E) Número total de entradas. DL: Dia de lactação. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; quando comparados às ratas não lactantes. Valores expressos como média \pm EPM (*One-way ANOVA* seguido do teste de *Newman-Keuls*).

Fonte: Da autora.

4.1.3 Comportamento maternal agressivo

A redução de ninhada acentuou o comportamento agressivo em ratas lactantes nos 7^o e 14^o DL (Fig. 6). Houve um aumento na latência do primeiro ataque no 14^o DL em ratas NR (de 100.1 ± 13.24 para 155.0 ± 20.85 s, $p < 0.05$; Fig. 6A), no número de ataques laterais no dia 7^o DL (de 7.00 ± 1.78 para 13.57 ± 2.39 , $p < 0.05$; Fig. 6C) e o número de ameaças laterais no 14^o DL (de 4.57 ± 0.48 para 13.14 ± 2.58 , $p < 0.001$; Fig. 6D), quando comparadas com ratas NN. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na frequência de ataques frontais ou no tempo de cuidado materno em nenhum dos dias avaliados.

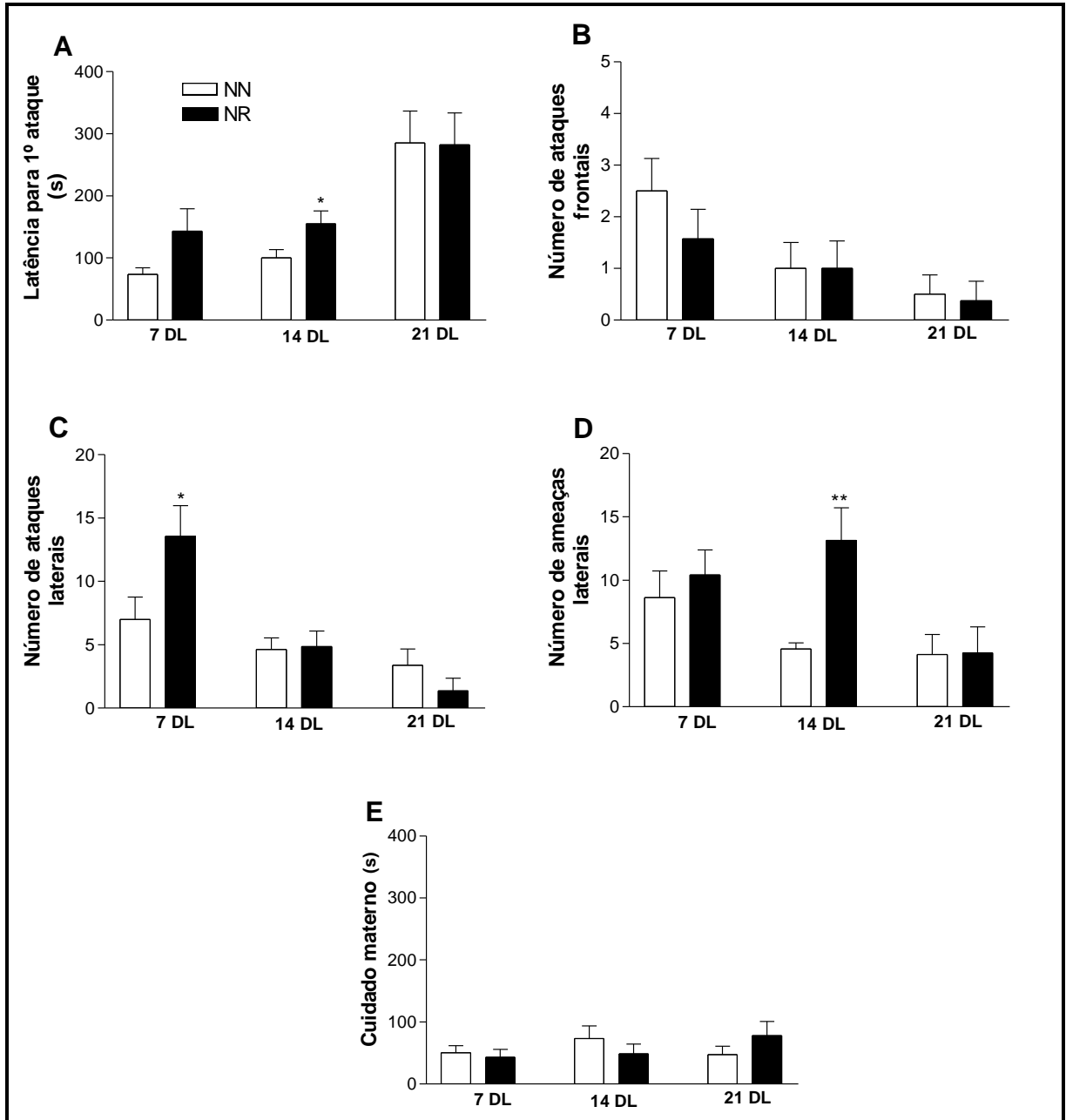


Figura 6. Avaliação do comportamento agressivo de ratas lactantes com ninhada reduzida (NR, n = 8) e com ninhada normal (NN, n = 8) ao longo do período lactacional. (A) Latência 1º ataque, (B) Ataque frontal, (C) Ataque lateral, (D) Ameaça lateral, (E) Tempo de cuidado materno. DL (dia de lactação). *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$, quando comparados com ratas com NN. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

4.2 GANHO DE PESO DA NINHADA

O ganho de peso corporal da ninhada nos dois grupos exibiram diferenças estatisticamente significantes desde o período lactacional até a fase adulta, sendo que os animais provindos de ninhada reduzida ganharam mais peso .

Durante a lactação (2^o ao 21^o dia de vida) o aumento de peso nos animais de ninhada reduzida foi significativo do 8^o ao 20^o DL quando comparados à filhotes de ninhada normal, sendo que esse aumento foi de 28,7% no oitavo dia de lactação, alcançando 47,3% no vigésimo dia de lactação ($p < 0.0001$, TABELA 2).

Tabela 2. Peso de proles criadas em ninhada reduzida (NR, n = 8) e em ninhada normal (NN, n = 8) durante o período lactacional. ***, $p < 0.0001$, quando comparados à prole provida de NN. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Animal	Peso (g)						
	2 ^o DL	5 ^o DL	8 ^o DL	11 ^o DL	14 ^o DL	17 ^o DL	20 ^o DL
NN	6.61 \pm 0.21	10.32 \pm 0.36	14.38 \pm 0.43	19.01 \pm 0.53	23.87 \pm 0.61	27.95 \pm 0.67	33.17 \pm 0.97
NR	7.27 \pm 0.25	11.95 \pm 0.45	18.51 \pm 0.52***	25.97 \pm 0.65***	33.76 \pm 0.81***	41.21 \pm 0.86***	48.85 \pm 1.05***

Fonte: Da autora

Após o desmame os animais passaram a ser pesados separadamente por sexo. O aumento de peso nos filhotes machos de ninhada reduzida foi de 73,9% na 4^a semana, 62,8% na 5^a semana, 32,2% na 6^a semana, 28,1% na 7^a semana 23,9% na 8^o semana ($p < 0.0001$, TABELA 3). As fêmeas criadas em ninhada reduzida tiveram um aumento de peso de 57,9% na 4^a semana de vida, 44,9% na 5^a semana, 32,4% na 6^a semana, 23,4% na 7^a semana, enquanto na 8^a semana esse aumento foi de 18,7% ($p < 0.0001$, TABELA 3).

Tabela 3. Ganho de peso de proles criadas em ninhada reduzida (NR, n = 8) e em ninhada normal (NN, n = 8) do pós-desmame até a fase adulta. ***, $p < 0.0001$, quando comparados à prole provinda de NN. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

		Peso (g)				
		4ª semana	5ª semana	6ª semana	7ª semana	8ª semana
Macho						
NN		37.6 \pm 1.17	62.4 \pm 3.54	101.5 \pm 5.68	140.5 \pm 6.28	177.1 \pm 10.41
NR		65.4 \pm 2.27***	101.6 \pm 3.52***	134.2 \pm 3.78***	180.0 \pm 4.50***	219.5 \pm 5.26***
Fêmea						
NN		34.3 \pm 0.57	61.0 \pm 0.67	93.73 \pm 1.30	126.7 \pm 1.84	149.5 \pm 2.29
NR		54.2 \pm 3.04***	88.5 \pm 4.17***	124.1 \pm 2.65***	156.3 \pm 1.94***	177.5 \pm 1.77***

Fonte: Da autora

Essa variação de peso evidencia-se de forma mais clara quando se faz a avaliação da taxa de ganho de peso. Para tal, dividiu-se o monitoramento do peso em três períodos: lactacional (2º ao 21º DL), juvenil (21º ao 35º dia de vida) e adulto jovem (35 ao 60º dia de vida).

A figura 7 mostra-nos a velocidade de ganho de peso nos animais NN e NR após o desmame. Tanto machos quanto fêmeas criados em ninhada maior tem a taxa de ganho de peso no período lactacional menor, quanto comparado aos animais provindos de NR ($p < 0.0001$). Passado este período, os animais NN apresentaram taxa de ganho de peso maior que os animais NN, sendo que nos machos houve diferença apenas no último período ($p < 0.0001$, Fig. 7A) e nas fêmeas em ambos os períodos ($p < 0.001$ e $p < 0.0001$, respectivamente, Fig. 7B).

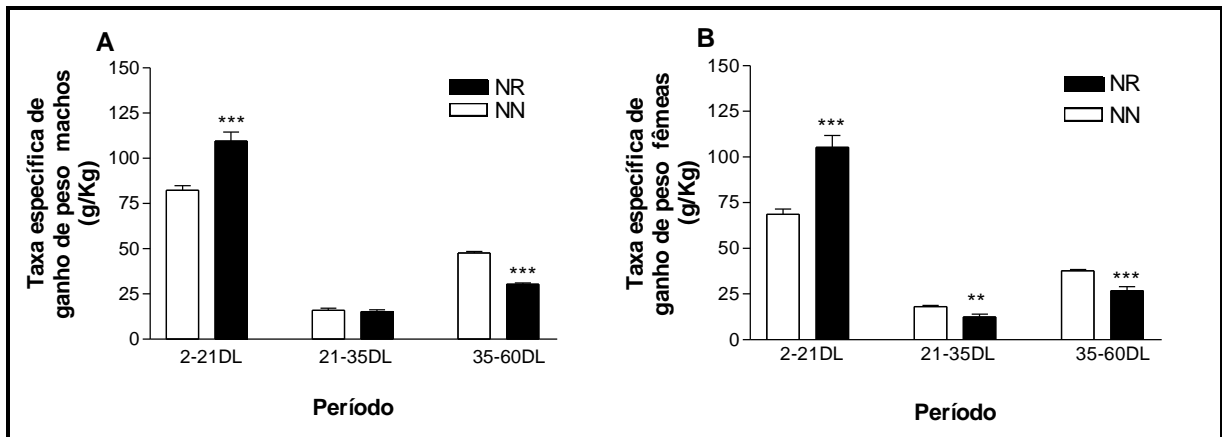


Figura 7. Taxa específica de ganho de peso de filhotes machos (A) e fêmeas (B) provindos de ninhada normal (NN, n=8) e ninhada reduzida (NR, n=8). **, p<0.001; ***p<0.0001 quando comparados com animais provindos de ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM. (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

4.3 INGESTÃO ALIMENTAR DOS FILHOTES

As figuras 8 e 9 demonstram o perfil alimentar dos animais machos e fêmeas provindos de ninhadas reduzida e normal, do desmame até a fase adulta (8 semanas de vida).

Quanto aos machos de ninhada reduzida, estes se apresentaram hiperfágicos desde a 4ª semana de vida até a 8ª semana. A ingestão de ração na 4ª semana aumentou de 6.03 ± 0.52 g para 9.17 ± 0.66 g, $p < 0.05$; na 5ª semana de 10.77 ± 0.52 g para 14.63 ± 0.90 g, $p < 0.001$; na 6ª semana de 13.56 ± 1.29 g para 20.15 ± 1.61 g, $p < 0.0001$; na 7ª semana de 16.41 ± 1.18 g para 21.03 ± 0.61 g, $p < 0.001$ e na 8ª semana de 21.87 ± 1.00 g para 27.65 ± 1.87 g, $p < 0.0001$ (Fig. 8A). A ingestão hídrica também se apresentou elevada a partir da 5ª semana em animais criados em ninhada menor. Na 5ª semana esse aumento foi de 20.0 ± 0.787 mL para 27.67 ± 2.20 mL, $p < 0.05$; na 6ª semana de 34.57 ± 2.30 mL para 44.25 ± 2.98 mL, $p < 0.001$; na 7ª semana de 38.75 ± 1.48 mL para 50.0 ± 1.41 mL, $p < 0.001$ e na 8ª semana de 38.62 ± 1.85 mL para 47.14 ± 1.45 mL, $p < 0.001$ (Fig. 8B) quando comparados com

filhotes de ninhada normal. Não houve diferenças na ingestão hídrica na 4ª semana de vida.

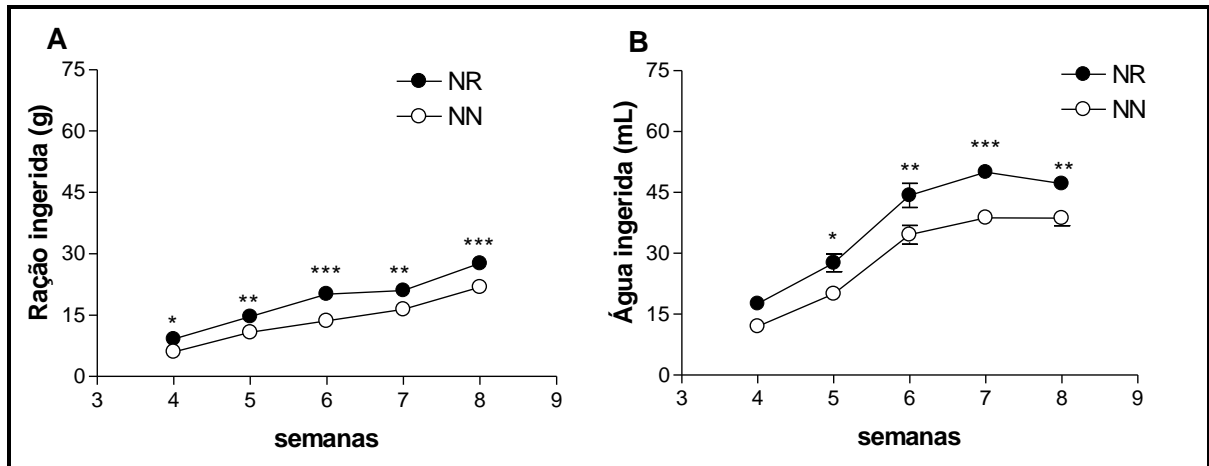


Figura 8. Ingestão alimentar em filhotes machos providos de ninhadas normal (NN, n=8), e reduzida (NR, n=8). (A) Ingestão de ração; (B) Ingestão hídrica. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.001$ quando comparados à ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (ANOVA two-way seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

Fonte: Da autora.

As fêmeas providas de ninhada reduzida apresentaram resposta semelhante à dos machos NR quanto à ingestão de ração e água, como se observa na figura 9. O aumento significativo na ingestão de ração nestes animais ocorreu em todos os períodos avaliados, sendo que na 4ª semana o aumento foi de $5.62 \pm 0.27\text{g}$ para $8.41 \pm 0.30\text{g}$, $p < 0.05$; na 5ª semana de $8.49 \pm 0.59\text{g}$ para $12.64 \pm 0.65\text{g}$, $p < 0.001$; na 6ª semana de $14.47 \pm 0.54\text{g}$ para $17.88 \pm 0.48\text{g}$, $p < 0.05$; na 7ª semana de $14.42 \pm 1.18\text{g}$ para $17.46 \pm 0.44\text{g}$, $p < 0.001$ e na 8ª semana de $15.61 \pm 1.45\text{g}$ para $18.44 \pm 0.68\text{g}$, $p < 0.05$, quando comparadas à ingestão em fêmeas providas de NN (Fig. 9A). Em relação à ingestão de água pelas fêmeas o aumento se deu da 4ª à 8ª semana (de $11.14 \pm 1.33\text{mL}$ para $21.67 \pm 1.62\text{mL}$, $p < 0.001$; de $16.14 \pm 1.72\text{mL}$ para $31.63 \pm 2.37\text{mL}$, $p < 0.0001$; de $30.75 \pm 2.04\text{mL}$ para 43.50 ± 2.95 , $p < 0.001$; de $30.75 \pm 1.35\text{mL}$ para $38.43 \pm 1.17\text{mL}$, $p < 0.05$ e de $33.37 \pm 2.05\text{mL}$ para $42.29 \pm 2.05\text{mL}$, $p < 0.05$; respectivamente, Fig. 9B).

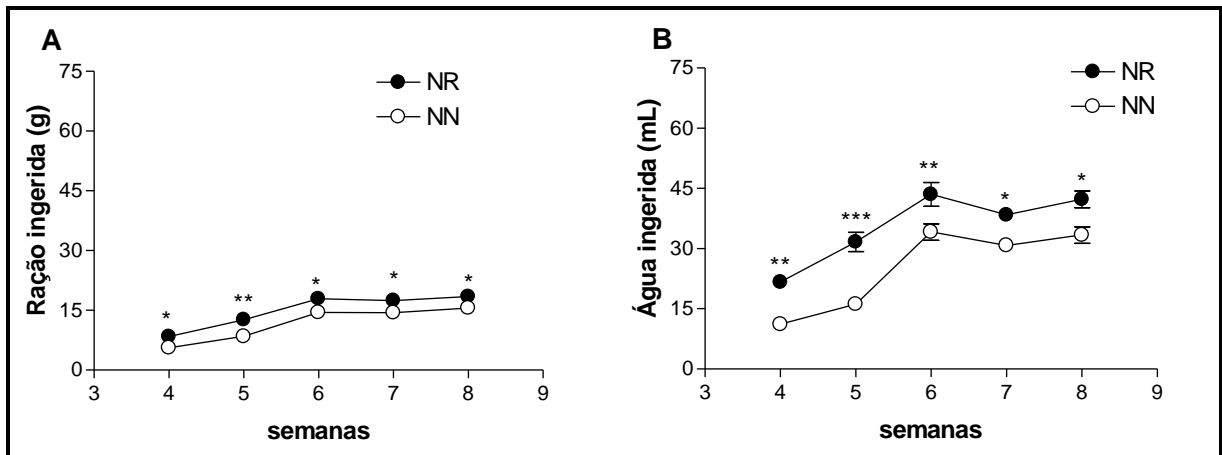


Figura 9. Ingestão alimentar em filhotes fêmeas providas de ninhada normal (NN, n=8) e ninhada reduzida (NR, n=8). (A) Ingestão de ração; (B) Ingestão hídrica. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.001$ quando comparados à filhotes providos de ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

Fonte: Da autora.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE

A caracterização da obesidade na fase adulta se deu pela avaliação do Índice de Lee, que consistiu na quantificação da adiposidade abdominal e avaliação do perfil bioquímico dos animais provenientes de NN e NR, aos 60 dias de idade.

4.4.1 Índice de Lee e Quantificação da adiposidade abdominal

Os animais NR apresentaram valores maiores do Índice de Lee, aos 60 dias de idade, tanto em machos quanto em fêmeas, quando comparados aos animais NN (TABELA 4).

Em relação ao acúmulo de gordura abdominal, os animais do grupo NR apresentaram aumento da adiposidade, decorrente do aumento no compartimento de tecido adiposo epididimal (+78,1%, $p < 0.0001$), ovariano (+95,2%, $p < 0.0001$) e retroperitoneal (+86,5% em machos, +64,0% em fêmea, $p < 0.0001$, TABELA 4), quando comparados com animais de ninhada grande.

Pode-se observar ainda que as fêmeas acumularam mais gordura retroperitoneal que os machos em ambos os grupos (NN: +26,3% e NR: +28,3%, $p < 0.05$).

Tabela 4. Índice de Lee e adiposidade de proles adultas provindas de ninhada reduzida (NR, $n = 16$) e de ninhada normal (NN, $n = 16$). ***, $p < 0.0001$, quando comparado à ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Parâmetros (g/100g)		Animal	
		NN	NR
Índice de Lee	Macho	3.15 \pm 0.02	3.22 \pm 0.01*
	Fêmea	2.84 \pm 0.04	3.00 \pm 0.02**
Adiposidade Epididimal		0.83 \pm 0.02	1.14 \pm 0.08***
Adiposidade Ovariana		1.04 \pm 0.07	2.06 \pm 0.19***
Retroperitoneal	Macho	0.71 \pm 0.04	1.23 \pm 0.78***
	Fêmea	0.90 \pm 0.06	1.58 \pm 0.17***

Fonte: Da autora.

4.4.2 Dosagens bioquímicas

Os filhotes machos advindos de ninhada reduzida apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de glicose em jejum (+12,4%, $p < 0.001$), triglicerídeos (+25,1%, $p < 0.05$), colesterol total (+20,3%, $p < 0.05$), VLDL-c (+25,1%, $p < 0.05$) e LDL-c (+105,3%, $p < 0.0001$, TABELA 5), quando comparados com animais criados em ninhada normal. Os níveis plasmáticos de HDL-c apresentaram-se diminuídos nos animais NR (-31,9%, $p < 0.0001$).

As fêmeas criadas em ninhada menor apresentaram aumento nos níveis séricos de glicose em jejum (+15,7%, $p < 0.001$), triglicerídeos (+49,3%, $p < 0.05$) colesterol total (+26,2%, $p < 0.05$), VLDL-c (+49,3%, $p < 0.05$) e LDL-c (+34,9%, $p < 0.05$, TABELA 5), quando comparadas com animais criados em ninhada grande. Os níveis plasmáticos de HDL-c nestes animais encontraram-se diminuídos (-26,5%, $p < 0.001$).

Tabela 5. Perfil bioquímico de ratos adultos machos e fêmeas provindos de ninhada reduzida (NR, n = 8) e de ninhada normal (NN, n = 8). *, p < 0.05, **, p < 0.001, ***, p < 0.0001, quando comparados à animais NN. Valores expressos como média ± EPM (Teste *t* de Student).

Parâmetro bioquímico (mg/dL)	Machos			Fêmeas		
	NN	NR	Razão NR/NN	NN	NR	Razão NN/NR
	Glicose	105.00±0.93	118.00±2.73**	1.12	97.87±2.40	113.20±4.07**
Triglicerídeos	135.70±11.70	169.80±10.61*	1.25	73.21±11.55	109.30±10.24*	1.49
Colesterol total	70.93±3.71	85.37±4.12*	1.20	70.88±3.40	89.48±7.84*	1.26
HDL-c	4.38±0.14	3.32±0.10***	0.76	4.67±0.29	3.69±0.15**	0.79
VLDL-c	27.14±2.34	33.96±2.12*	1.25	14.64±2.31	21.86±2.04*	1.49
LDL-c	24.98±2.66	51.28±5.32***	2.05	46.31±3.47	62.47±5.68*	1.35

Fonte: Da autora.

4.5 DOSAGEM HORMONAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA

A tabela 6 mostra o resultado das dosagens hormonais realizada em filhotes machos e fêmeas criados em ninhada normal e reduzida na fase adulta.

Dos hormônios dosados, os machos de ninhada reduzida apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de leptina (+178,3%, p < 0.001) quando comparados com machos de ninhada normal. Os níveis séricos de insulina e adiponectina em animais NR não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos animais NN.

As fêmeas que foram criadas em ninhada maior apresentaram aumento nos níveis séricos de insulina (+41,4%, p < 0.05) e de leptina (+138,6, p < 0.0001), porém não apresentaram diferenças estatísticas nos níveis de adiponectina quando equiparadas às fêmeas criadas em ninhada normal.

Tabela 6. Perfil hormonal de ratos adultos machos e fêmeas provindos de ninhada reduzida (NR, n = 7) e de ninhada normal (NN, n = 7). *, p < 0.05, **, p < 0.001, ***, p < 0.0001, quando comparados à animais NN. Valores expressos como média ± EPM (Teste *t* de Student).

Hormônio	Animais			
	Machos		Fêmeas	
	NN	NR	NN	NR
Insulina (ng/mL)	0.52±0.04	0.56±0.07	0.29±0.01	0.41±0.04*
Leptina (ng/dL)	0.69±0.10	1.92±0.25**	0.70±0.06	1.67±0.05***
Adiponectina (ng/dL)	4.58±0.24	4.05±0.26	5.06±0.02	4.97±0.27

Fonte: Da autora.

4.6 TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE

O perfil glicêmico durante o GTTo em animais machos e fêmeas provenientes de ninhada normal e reduzida é apresentado na figura 10. Os animais machos NR apresentaram diferenças nos tempos de 0, 30 e 60 minutos após a carga glicêmica, sendo que os níveis de glicose foram maiores nesses animais (118.0 ± 2.739 , $p < 0.001$; 172.2 ± 10.78 , $p < 0.001$; 154.6 ± 6.99 , $p < 0.05$; Fig. 10 A). Na análise da área sobre a curva os machos de ninhada pequena também apresentaram aumento quando comparados a machos de ninhada grande (de 15050 ± 665.0 para 16910 ± 391.4 , $p < 0.05$, Fig 10B). As fêmeas de ninhada reduzida apresentaram níveis glicêmicos significativamente maiores que as de ninhada normal, a partir do tempo 0 minutos após a ingestão da carga de glicose (113.2 ± 4.07 , $p < 0.001$ ao 0 min.; 170.9 ± 9.59 , $p < 0.05$ aos 30 min.; 151.4 ± 6.72 , $p < 0.001$ os 60 min.; 140.7 ± 3.95 , $p < 0.001$ e 134.7 ± 5.38 aos 120 min.; Fig. 10C). As fêmeas de ninhada reduzida apresentaram área sobre a curva maior (2101 ± 65.49 , $p < 0.05$, Fig. 10D) que as fêmeas de ninhada normal.

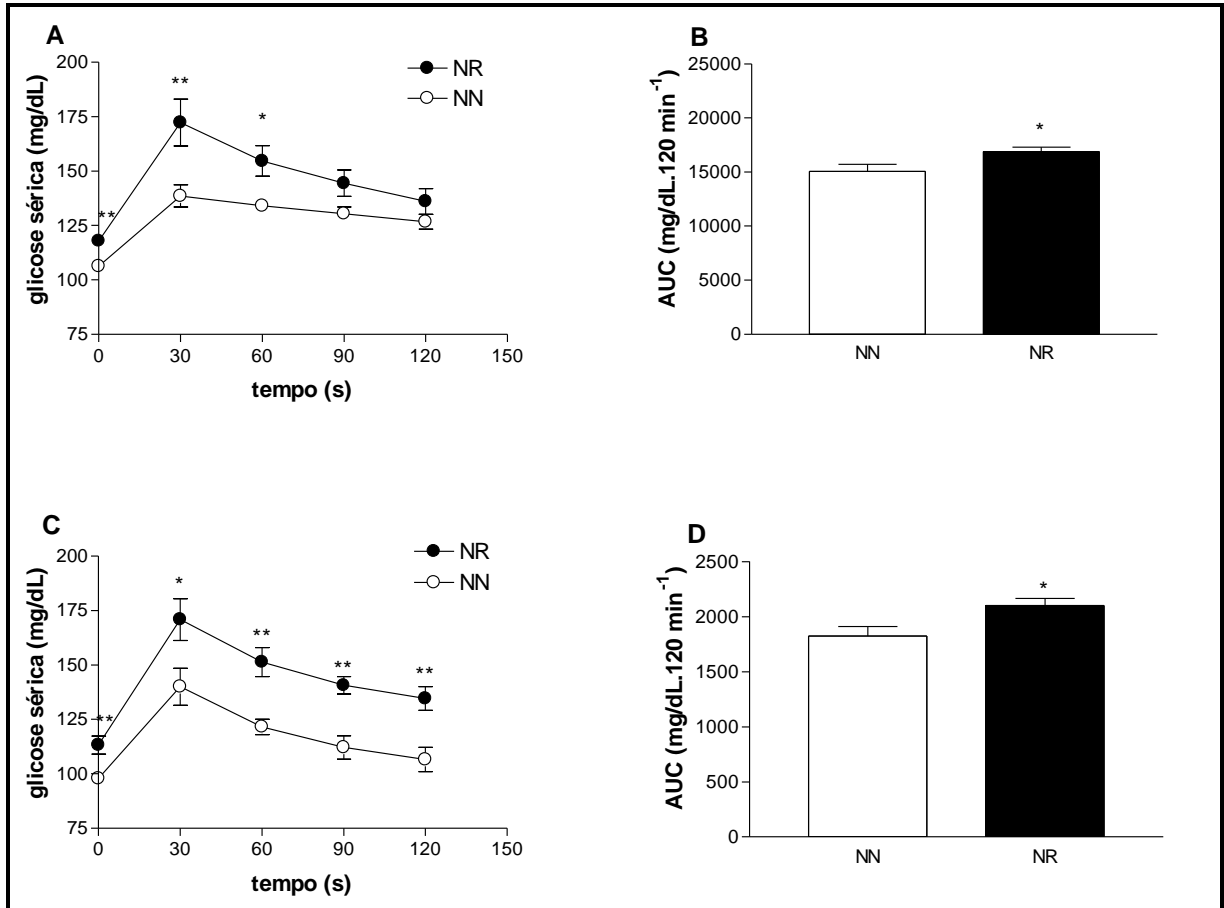


Figura 10. Perfil glicêmico dos ratos do provindos de ninhada normal (NN, n=7) e ninhada reduzida (NR, n=7) mediante ao teste de tolerância oral à glicose. A) Níveis plasmáticos de glicose em machos; B) Área sobre a curva de filhotes machos; C) Níveis plasmáticos de glicose em fêmeas; B) Área sobre a curva de filhotes fêmeas. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$ quando comparado à ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (Teste t de Student).

Fonte: da autora.

4.7 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA

Os animais machos criados em ninhada pequena apresentaram níveis de glicemia significativamente superiores nos tempos 12 (71.13 ± 3.92 , $p < 0.05$) e 16 minutos (56.70 ± 4.17 , $p < 0.05$) em comparação com os animais de ninhada maior (Fig. 11A), no teste de ITTi. As fêmeas NR apresentaram níveis elevados de glicose em relação aos animais NN nos tempos 4 (95.20 ± 1.45 , $p < 0.05$), 8 (66.58 ± 3.44 , $p < 0.05$), 12 (51.24 ± 1.15 , $p < 0.001$) e 16 minutos (43.73 ± 2.44 , $p < 0.05$, Fig. 11B).

A taxa de decaimento de glicose (K_{ITT}) foi inferior tanto em machos NR (3.00 ± 0.32 , $p < 0.0001$, Fig. 11C) quanto em fêmeas NR (5.72 ± 0.31 , $p < 0.05$, Fig. 11D), quando comparados aos seus controles de ninhada normal.

O índice HOMA demonstrou-se maior em animais que foram criados em NR quando comparados aos filhotes provindos de NN, tanto em machos (3.37 ± 0.18 vs. 5.36 ± 0.75 , $p < 0.05$) quanto em fêmeas (1.99 ± 0.13 vs. 3.24 ± 0.38 , $p < 0.05$). O índice TyG também foi maior em animais de ninhada menor, em ambos sexos (de 8.64 ± 0.14 vs 9.29 ± 0.09 , $p < 0.001$ em machos e de 8.14 ± 0.16 para 8.68 ± 0.06 , $p < 0.05$ em fêmeas).

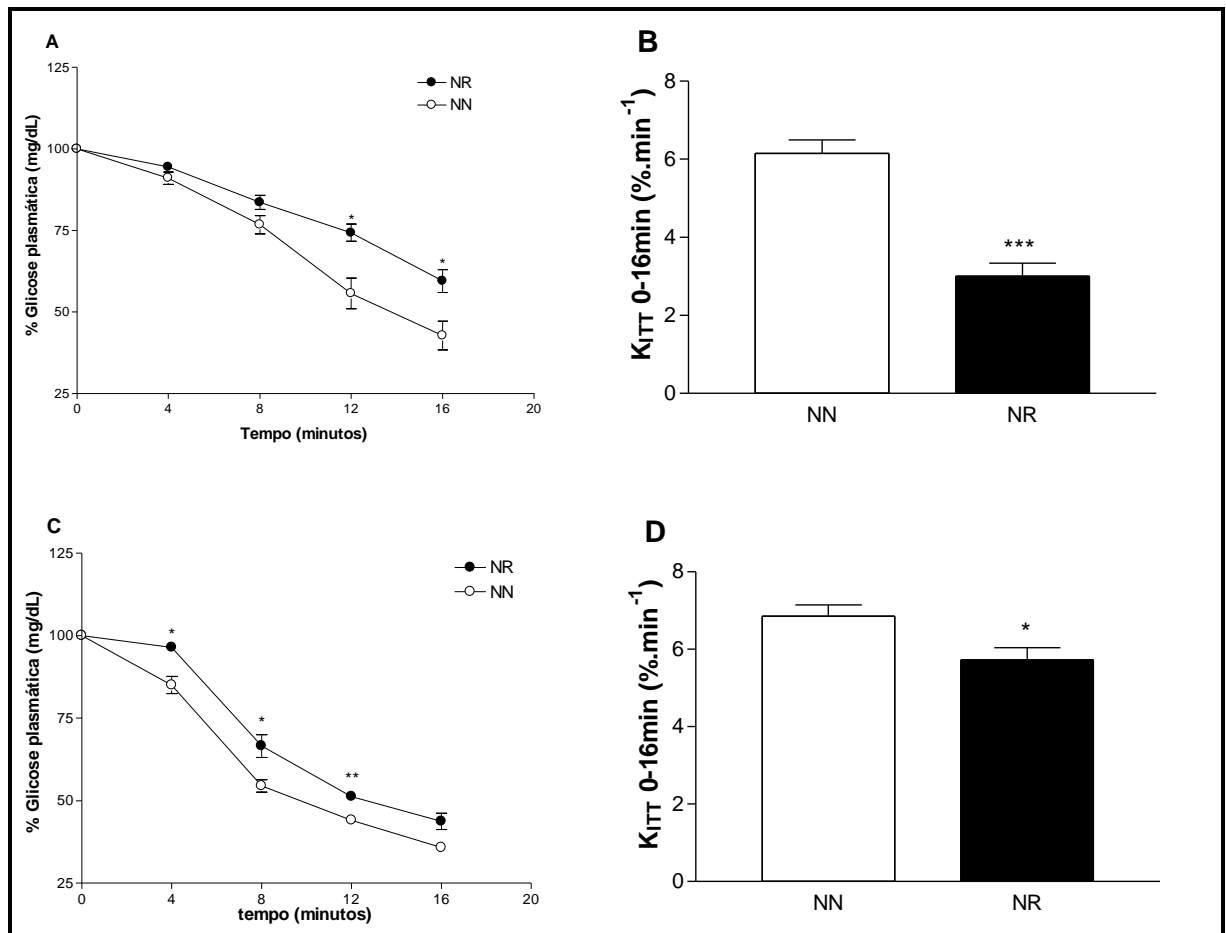


Figura 11. Perfil glicêmico dos ratos do provindos de ninhada normal (NN, n=7) e ninhada reduzida (NR, n=7) mediante o teste de tolerância intraperitoneal à insulina. A) Níveis plasmáticos de glicose em machos; B) Taxa de decaimento de glicose (K_{ITT}) em filhotes machos; C) Níveis plasmáticos de glicose em fêmeas; B) Taxa de decaimento de glicose (K_{ITT}) em filhotes fêmeas. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$ quando comparado à ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (Teste t de Student).

Fonte: da autora.

4.8 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES NA FASE ADULTA

4.8.1 Labirinto em Cruz Elevado

De acordo com a figura 12 e 13, pode-se observar que os filhotes adultos das mães de NR e NN, tanto machos (Fig. 12) quanto fêmeas (Fig. 13) não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros avaliados neste teste.

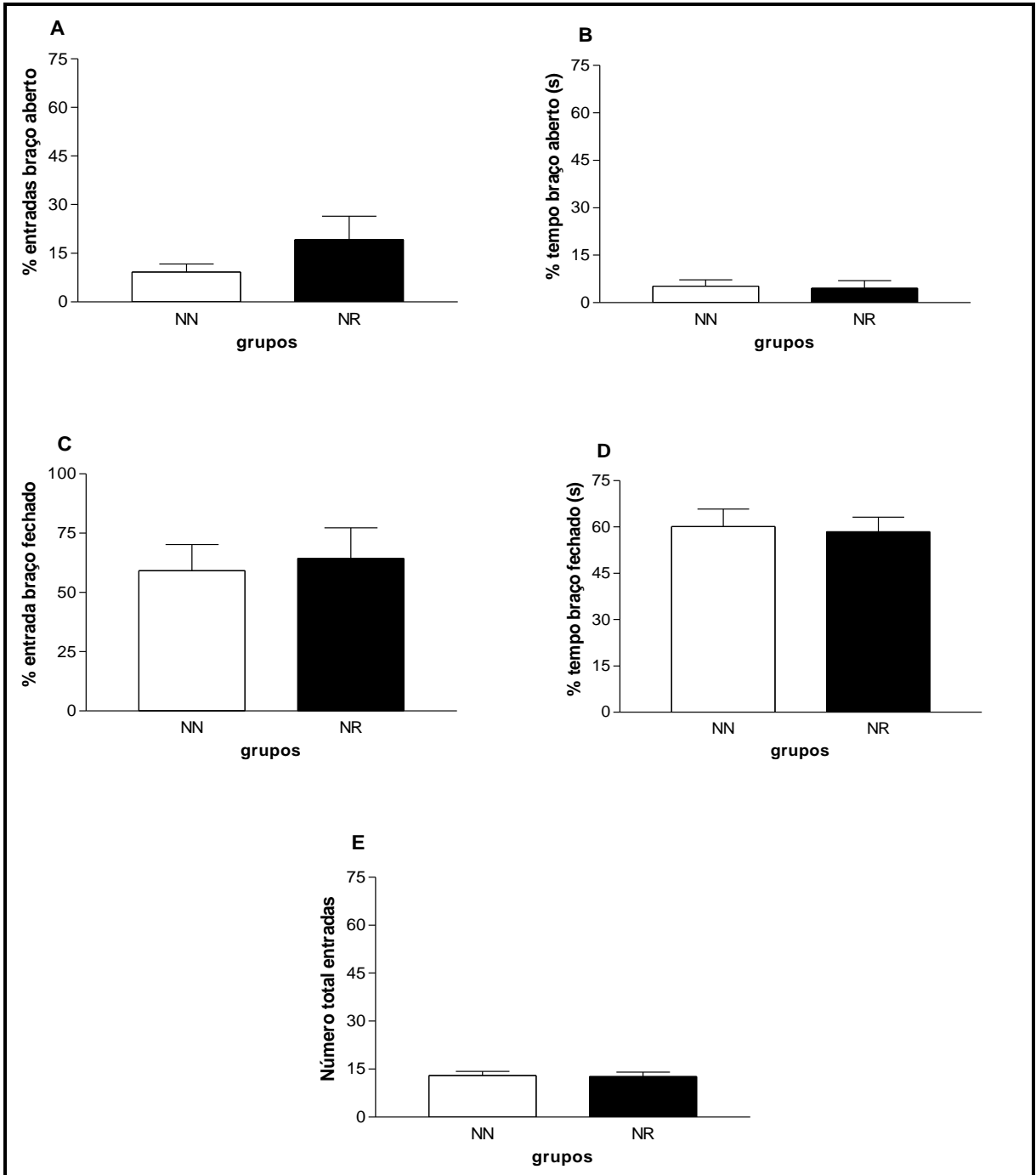


Figura 12. Teste de labirinto em cruz elevado em machos provindos de ninhada reduzida (NR, n = 8) e de ninhada normal (NN, n = 8). (A) % entradas nos braços abertos, (B) % tempo nos braços abertos, (C) % entradas nos braços fechados, (D) % tempo nos braços fechados, (E) Número total de entradas. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

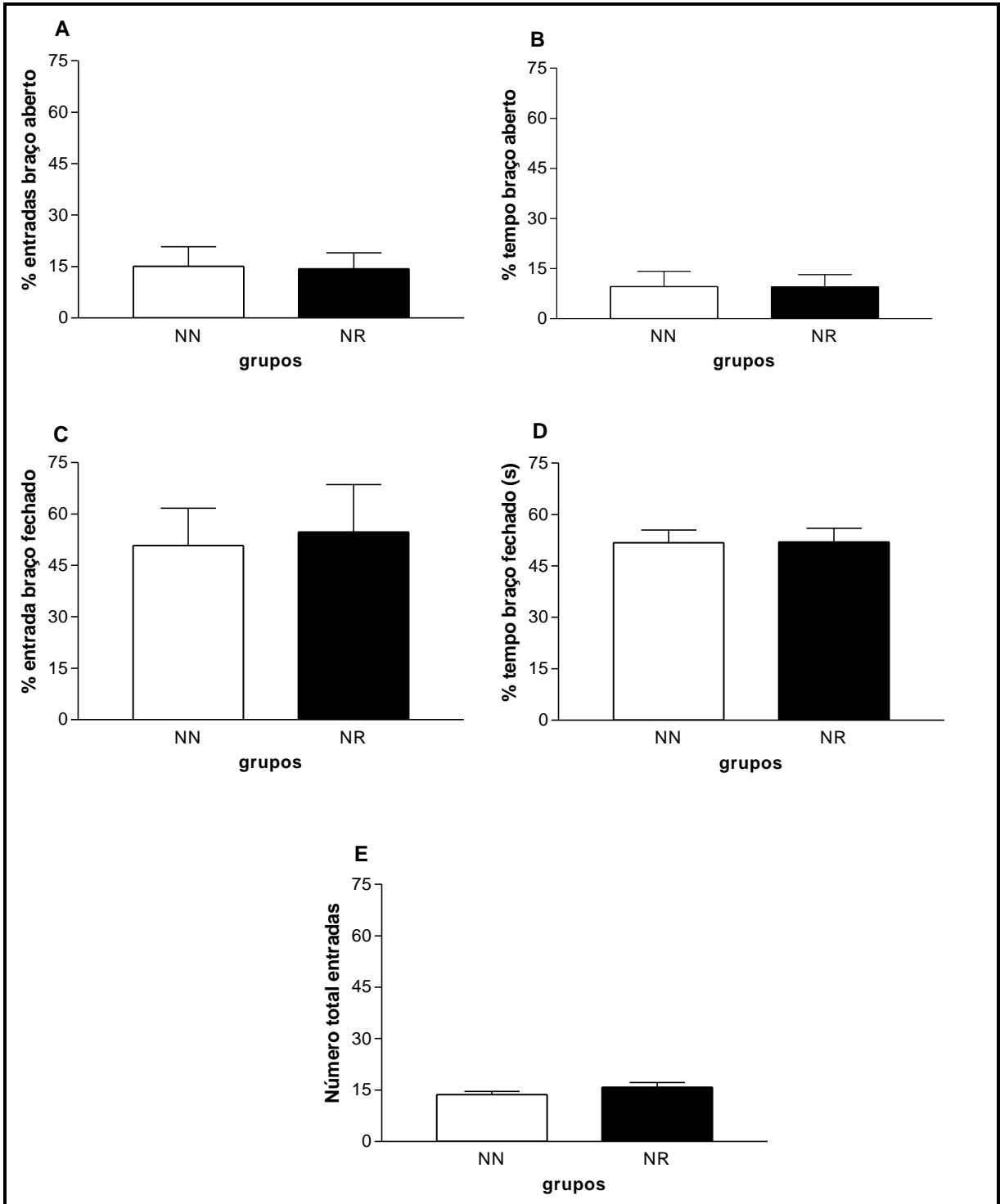


Figura 13. Teste de labirinto em cruz elevado em fêmeas provindas de ninhada reduzida (NR, n = 8) e de ninhada normal (NN, n = 8). (A) % entradas nos braços abertos, (B) % tempo nos braços abertos, (C) % entradas nos braços fechados, (D) % tempo nos braços fechados, (E) Número total de entradas. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

4.8.2 Campo aberto

A avaliação do teste de campo aberto demonstrou que os filhotes machos (Fig. 14A, $p < 0.05$) e fêmeas (Fig. 15A, $p < 0.001$) das mães de ninhada reduzida cruzaram mais o centro e exibiram efeito anti-tigmotático aumentado (Fig. 14E, 15E, $p < 0.001$) quando comparados com aqueles filhotes machos e fêmeas de mães com NN. As figuras 14D e 15D demonstram que a redução de ninhada não interferiu no número de cruzamentos totais, que indica que não houve prejuízo na locomoção desses animais, tanto em fêmeas quanto em machos. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos e nem entre o sexo dos animais.

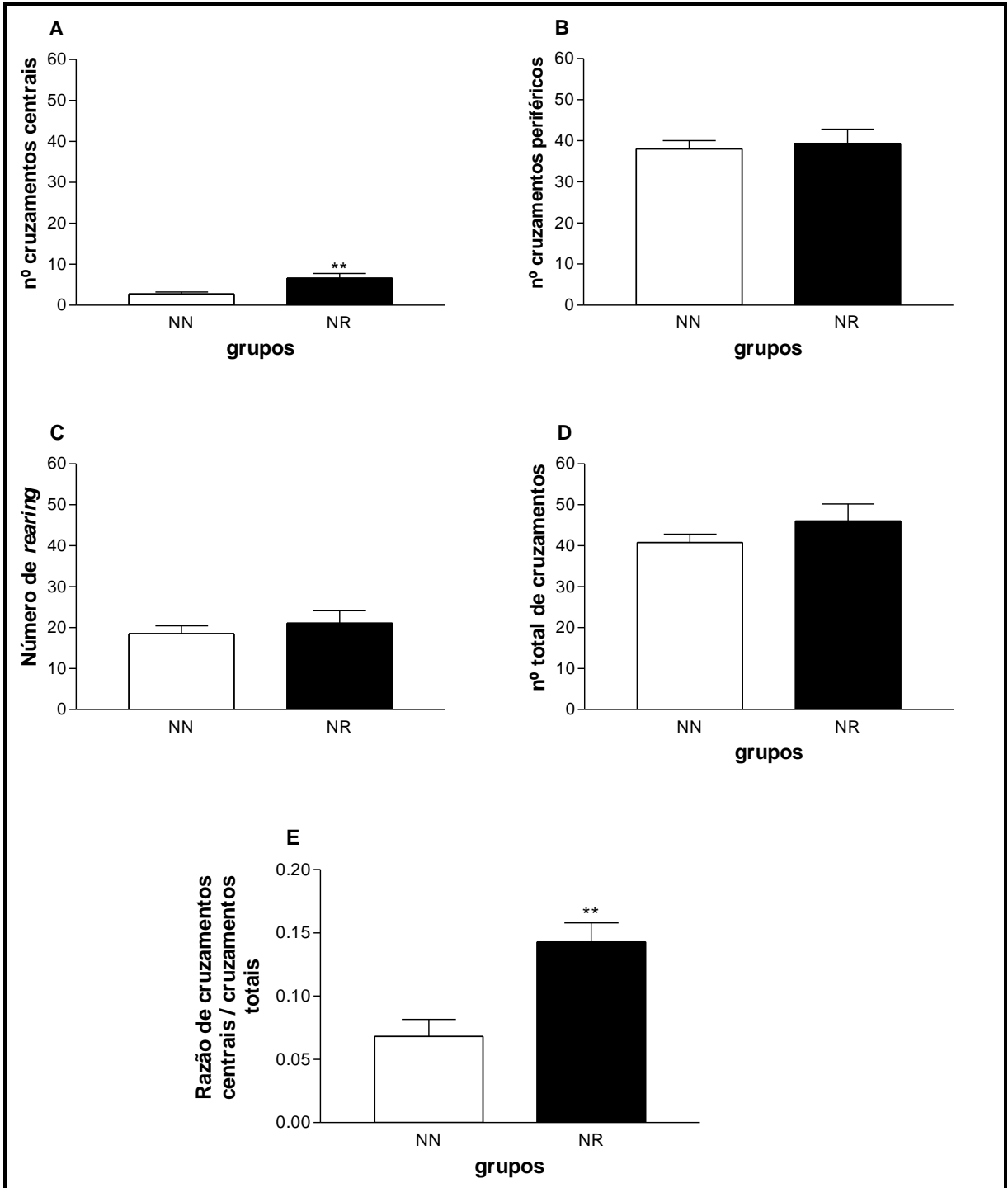


Figura 14. Teste de campo aberto em machos provindos de ninhada reduzida (NR, n = 8) e de ninhada normal (NN, n = 8). (A) Número de cruzamentos centrais, (B) número de cruzamentos periféricos, (C) número de *rearing*, (D) número de cruzamentos totais, (E) Razão de cruzamentos centrais / cruzamentos totais. *, p < 0.05; **, p < 0.01. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

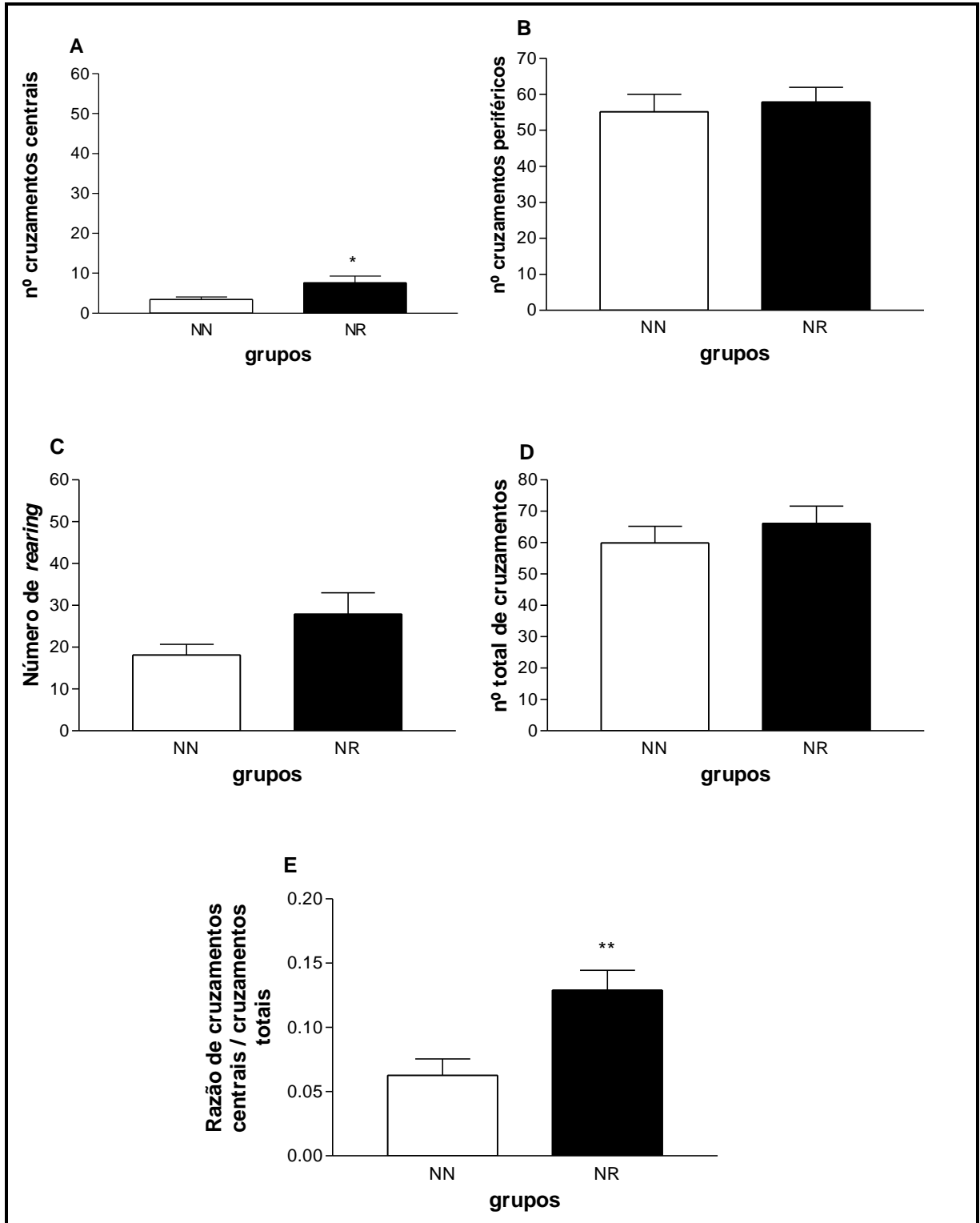


Figura 15. Teste de campo aberto em fêmeas providas de ninhada reduzida (NR, $n = 8$) e de ninhada normal (NN, $n = 8$). (A) Número de cruzamentos centrais, (B) número de cruzamentos periféricos, (C) número de *rearing*, (D) número de cruzamentos totais, (E) Razão de cruzamentos centrais / cruzamentos totais. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

4.8.3 Medo condicionado ao contexto

Na figura 16 A e B observa-se a resposta de machos e na figura 16 C e D de fêmeas advindos de ninhada normal e ninhada reduzida, no teste de medo condicionado ao contexto.

Filhotes machos provindos de ninhada reduzida apresentaram diminuição do tempo de *freezing* no grupo condicionado (de 367.0 ± 66.16 para 200.8 ± 32.87 s, $p < 0.05$, Fig. 16B), quando comparados aos filhotes machos provindos de ninhada normal. Não houve diferenças estatísticas quanto ao tempo de latência para o primeiro *freezing* nos grupos condicionado e não condicionado, bem como no tempo de *freezing* no grupo não condicionado.

A resposta das fêmeas foi semelhante à dos filhotes machos. Fêmeas criadas em ninhada pequena apresentaram diminuição no tempo de *freezing* no grupo condicionado (de 170.0 ± 7.74 para 65.6 ± 22.25 s, $p < 0.0001$, Fig. 16D). A latência para o primeiro *freezing* nos grupos condicionado e não condicionado e o tempo de *freezing* no grupo não condicionado não apresentaram diferenças estatísticas.

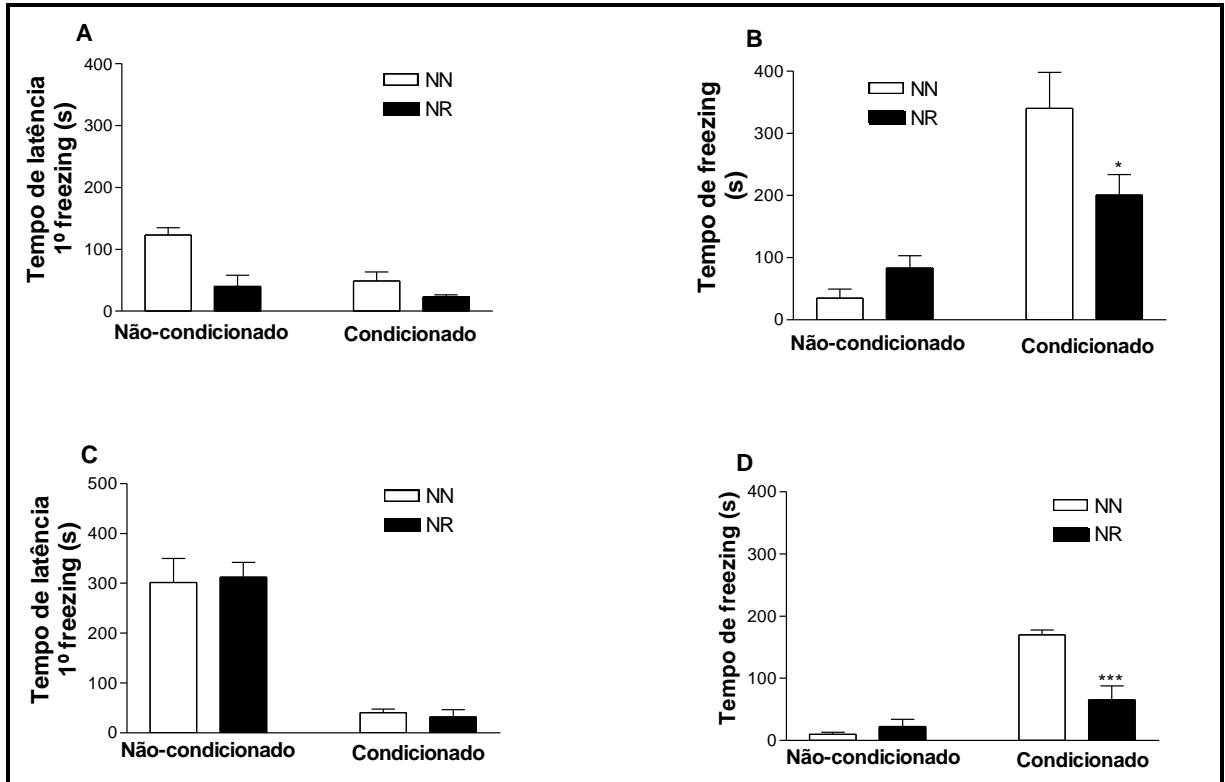


Figura 16. Teste de medo condicionado ao contexto em filhotes machos (A e B) e fêmeas (C e D) provindos de ninhada reduzida (NR) e ninhada normal (NN). (A) Latência para 1º *freezing* em machos, (B) tempo de *freezing* (s) em machos, (C) Latência para 1º *freezing* em fêmeas, (D) tempo de *freezing* (s) fêmeas. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.0001$ quando comparados com filhotes de ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

Fonte: Da autora.

5 DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DA REDUÇÃO DE NINHADA SOBRE O COMPORTAMENTO MATERNO

O ambiente nutricional neonatal, no qual a rata lactante tem papel primordial, bem como alteração no tamanho da ninhada na qual os animais serão criados tem implicações importantes nas funções endócrinas e comportamentais a longo prazo (HABBOUT et al., 2013).

No presente estudo, a redução do tamanho da ninhada enfatizou o comportamento materno total em ratas lactantes, aumentando o tempo de cifo das mães, a lambida nos filhotes e diminuindo o cuidado não materno total e o tempo que a mãe passa longe dos filhotes.

A análise semanal do comportamento materno permitiu a identificação dos parâmetros que, de fato, sofreram maior alteração pela redução de ninhada. O aumento do CDMT ocorreu no decorrer das primeira e segunda semanas de lactação. Neste período, os parâmetros maternais mais alterados foram cifo e lambida, que se encontraram aumentados. De forma complementar, neste mesmo período houve menor CDñMT exibido por essas ratas com diminuição principalmente nos parâmetros alimentação e longe dos filhotes.

Na terceira semana apenas os comportamentos de lambida e *self grooming* permaneceram elevados em ratas NR e o comportamento de alimentação diminuído. O CDMT e CDñMT não apresentaram diferenças estatísticas nesta semana. Essa reversão nos comportamentos de cifo e a permanência longe dos filhotes (que favorecem o contato da mãe com o filhote) pode ser explicada pelo fato de que, até aproximadamente o 12º dia de vida, ser a mãe quem toma a iniciativa de se aproximar dos filhotes. Após esse período, os filhotes estão aptos a se locomover e a deixar o ninho, quando passam a ser eles que se aproximam da mãe para requerer cuidados (GROTA; ARDER, 1974).

Uma possível hipótese para explicar o fato de mães NR tornarem-se mais maternas que mães NN foi levantada por Priestnall (1972) em um estudo com camundongos, no qual as mães gastavam menos tempo no ninho e lambendo os

animais e mais tempo comendo, bebendo e explorando ao cuidarem de ninhadas maiores. Esse autor associa a diminuição do CM a algum fator aversivo como a fadiga ou desconforto induzido nas mães de ninhadas maiores que podem servir como um sinal de inibição no comportamento maternal. O desconforto produzido pelo contato excessivo e interferência da ninhada ou de estimulação extra da região mamária durante a sucção poderia também resultar em fêmeas com ninhadas maiores que deixam o ninho com mais frequência. Grandes ninhadas exigem mais nutricionalmente de sua progenitora, favorecendo comportamentos como a alimentação, a fim de fornecer leite suficiente para sustentá-las. Mesmo quando a ração é fornecida dentro do ninho, fêmeas de camundongo que cuidam de ninhada grande permanecem com comportamentos maternos diminuídos.

Mães de ninhadas maiores parecem estar mais preocupadas com sua própria segurança e não a de sua ninhada, enquanto que mães com ninhada reduzida parecem sacrificar mais sua segurança em prol dos filhotes, permitindo a elas arriscarem-se mais em comportamentos de exploração e defesa, confirmado em nosso estudo pelo aumento da agressividade e ansiólise maternal em mães NR. Esse comportamento pode ter bases instintivas, conforme afirma Seitz (1958). Comportamentos maternos elevados entre mães de ninhada pequena podem garantir a sobrevivência desses filhotes protegendo-os de outras perdas (falta de alimento, predadores, etc).

A reestruturação do padrão comportamental em ratas com ninhada reduzida (aumento de cifo e diminuição do tempo que as mães passam longe do ninho) favorece a chegada de alimento para os filhotes, uma vez que a rata lactante passa mais tempo com sua ninhada e a amamentação é facilitada pela posição em cifo (GUBERNICK; ALBERTS, 1985). É bem discutido na literatura que, ao diminuir a quantidade de filhotes por mãe, competição pelo leite também é diminuída e a disponibilidade do alimento é aumentada (FIOROTTO et al., 1991; CUNHA et al., 2009; HABBOUT et al., 2013). Porém, se a rata lactante não permanecesse no ninho permitindo a sucção dos filhotes, esse ambiente nutricional favorável não seria relevante.

A redução de ninhada influenciou ainda o sistema de resposta comportamental acentuando o efeito adaptativo durante a lactação, promovendo redução nos parâmetros de ansiedade em ratas NR, quando comparadas às ratas lactantes com ninhada normal e ratas não lactantes, principalmente. O

comportamento de ansiedade em ratas lactantes é modulado por várias alterações hormonais e também pelos filhotes. Assim, a presença da ninhada pode induzir ou potencializar a ansiólise em campo aberto (FLEMING; LUEBKE, 1981) e testes de conflito (FERREIRA et al., 1989). A maneira pela qual os filhotes podem reduzir as respostas de ansiedade é pouco conhecida, mas, provavelmente se baseiam no aumento da motivação dos animais em gastar energia e na superação da adversidade para garantir sua própria sobrevivência e a de seus filhotes (BOSH; NEUMANN, 2008; NEUMANN, 2008).

O número reduzido de filhotes na ninhada também promoveu aumento da agressividade em suas mães, na primeira e segunda semanas de lactação. O desencadeamento e manutenção do comportamento agressivo em ratos se dá pelas mudanças hormonais ocasionadas pela gestação e pela presença dos filhotes e sua estimulação somatossensorial por meio da sucção (GIOVENARDI et al., 2000). Essa hipótese explica o aumento desse comportamento em ratas com ninhada pequena, uma vez que estas passam mais tempo com sua ninhada, podendo receber mais estímulos, mesmo com número menor de filhotes. Os resultados do presente estudo sugerem ainda que a idade do filhote pode afetar o comportamento maternal agressivo. A partir do 10º DL há um declínio natural desse comportamento, decorrente do maior desenvolvimento dos filhotes e independência da mãe (ALBERT; WASH, 1995), assim em períodos precoces do pós-parto o instinto agressivo se apresentaria maior, como visto neste estudo.

A atenção materna que o filhote recebe durante o período neonatal tem, portanto, o potencial de afetar o desenvolvimento comportamental precoce. Estudos anteriores relataram que o nível de atenção dedicada por mães de ratos de laboratório para filhotes individualmente, parece ser independente do tamanho da ninhada (CHAMPAGNE et al., 2003), mas este estudo demonstrou o contrário. Mães de ninhadas menores dedicaram mais atenção aos seus filhotes. Este maior cuidado dispensado pelas mães para os filhotes, inclusive dentro de ninhadas diferentes, pode ser potencialmente relevante para o desenvolvimento de padrões de comportamento e habilidades durante o início da vida.

5.2 CONSEQUÊNCIAS DA REDUÇÃO DE NINHADA E DO COMPORTAMENTO MATERNO NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E ENDÓCRINAS DA PROLE QUANDO ADULTA

No presente estudo, reforçamos o conceito de programação metabólica, processo pelo qual distúrbios nutricionais durante o início da vida podem desencadear adaptações metabólicas e hormonais que podem perdurar até a idade adulta (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; 2001). Especificamente, nossos resultados reforçam a importância de uma nutrição adequada durante o período de aleitamento e sugerem que a supernutrição, principalmente durante a lactação, pode ser determinante para desencadear efeitos prejudiciais para a saúde a longo prazo.

Nossos dados mostraram que a supernutrição pela redução do tamanho da ninhada e, por conseguinte, um maior acesso ao leite, alterou permanentemente o comportamento alimentar da prole, induzindo aumento de peso e hiperfagia precoce que persistiu até a idade adulta.

Filhotes criados em ninhada reduzida apresentaram aumento de peso desde o 8º DL até a fase adulta (60 dias), com ganho de peso mais exacerbado no período lactacional, decaindo após o desmame até a completa inversão da taxa de ganho de peso em filhotes NR. De acordo com Fiorotto et al. (1991) e Shankar et al. (2008), a redução do número de filhotes altera a quantidade e a qualidade da produção do leite, o qual passa a apresentar maior conteúdo de gordura; eleva a disponibilidade de nutrientes para os filhotes de ratos durante a amamentação e melhora os cuidados com a prole. Por conseguinte, ocorre maior ingestão alimentar, uma vez que há imaturidade do mecanismo de controle do comportamento ingestivo dos filhotes nessa idade, resultando em maior ganho de peso corporal (MCMILLEN; ADAM; MUHLHAUSLER, 2005).

O quadro de hiperfagia, apresentado do desmame até a fase adulta, tem também função primordial no ganho de peso. Esta persistente hiperfagia pode ser consequência de um distúrbio no mecanismo de *feedback* negativo da insulina, acompanhado de má formação do núcleo hipotalâmico ventromedial (VHM), região envolvida no controle da ingestão alimentar e da massa corporal (OOMURA, 1983; SCHWARTZ et al., 1996). Plagemman et al. (1999a) defendem a ideia de que o sobrepeso e a hiperfagia também podem se dever a redução na sensibilidade a

leptina no hipotálamo desses animais, hormônio que participa do controle alimentar. Normalmente, a injeção de leptina reduz a ingestão alimentar, porém em vários tipos de obesidade em animais experimentais e em seres humanos, observa-se um quadro de hiperfagia, apesar de hiperleptinemia, sugerindo o desenvolvimento de resistência a esse hormônio (LEVIN; ROUT, 1996; MANTZOROS, 1999).

Os resultados apontam ainda que a redução do número de filhotes da prole durante o período lactacional foi eficaz para indução da obesidade. Esses animais apresentaram prejuízo no perfil lipídico, acúmulo elevado de gordura visceral e aumento no índice de Lee (índice preditor de obesidade), quando adultos.

O perfil bioquímico dos animais revelou aumento nos níveis de colesterol total, TG, VLDL-c, LDL-c e diminuição nos níveis de HDL-c. Alterações encontradas nos animais NR apontam para um quadro de dislipidemia, que se relaciona à resultados da literatura (NASCIMENTO et al., 2008; HAHN, 1984). Os ácidos graxos na circulação estão aumentados, provavelmente, pelo elevado processo de lipólise nos adipócitos. Este fato, associado ao desenvolvimento da resistência à insulina nas células adiposas, resulta no acúmulo de ácidos graxos livres na circulação. Este acúmulo leva a uma série de alterações em tecidos não lipídicos (músculo esquelético, fígado e pâncreas) e promove modificações na ação e na dinâmica da insulina (FONTES, 2003; MANCO; CALVANI; MINGRONE, 2004), que culminam com um quadro dislipidêmico.

A análise da composição corporal demonstrou que a superalimentação pós-natal leva ao maior ganho de massa, principalmente devido ao aumento na gordura abdominal. Proles de ninhada reduzida, machos e fêmeas, apresentaram maior acúmulo de gordura visceral em todas as áreas avaliadas (epididimal, ovariana e retroperitoneal). É sugerido que o maior depósito de gordura nos animais criados em ninhadas reduzidas esteja relacionado ao aumento na atividade de enzimas lipogênicas nos adipócitos (MOZES et al., 2004). Reforçando essa hipótese, Velkoska e colaboradores (2005) demonstraram que animais com 120 dias superalimentados após o nascimento, apresentam aumento no mRNA da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase 1 (11 β -HSD1) nas células adiposas. Esta enzima converte corticosterona em cortisol, que aumenta a lipogênese, principalmente, em adipócitos abdominais (LIVINGSTONE; KENYON; WALKER, 2000).

Estudos revelam que o aumento na gordura visceral está diretamente relacionado à síndrome metabólica, à mortalidade cardiovascular (BARROSO;

ABREU; FRANCISCHETTI, 2002; CARNEIRO et al., 2003; RIBEIRO-FILHO et al., 2006) e resistência à insulina. A gordura visceral produz mais citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e interleucina 6) e menos adiponectina. Tais alterações induzem a resistência insulínica e atuam na patogênese da disfunção endotelial e subsequente aterosclerose (HAMDY; PORRAMATIKUL; AL-OZAIRI, 2006). Como resultado desta resistência, há hiperglicemia (BELFIORE; IANNELLO, 1998). Nossos achados estão de acordo com estas informações, pois detectamos maior glicemia e RI, apesar da insulinemia normal em machos, evidenciando a intolerância à glicose e resistência insulínica na vida adulta neste modelo experimental, comprovada pelo aumento no índice HOMA e TyG e diminuição do K_{ITT} (taxa de decaimento de glicose).

O acúmulo de ácidos graxos contribui, ainda, para o aumento dos níveis de vários metabólitos celulares, que alteram o processo de translocação do GLUT-4. Entre os metabólitos aumentados, sugere-se que o diacilglicerol, o acetil-CoA de cadeia longa e o TNF- α diminuem a ação da insulina diretamente (inibindo a proteína quinase B através da ativação de ceramidas) ou indiretamente (estimulando a proteína quinase C). A ativação da proteína quinase C reduz o processo de fosforilação da tirosina do primeiro substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), utilizando a fosforilação serina-treonina, reduzindo o sinal da insulina. No pâncreas, a exposição prolongada aos ácidos graxos pode levar à diminuição da liberação de insulina através dos mecanismos de lipotoxicidade, com disfunção e até apoptose das células- β . No fígado, os ácidos graxos promovem aumento do processo de gliconeogênese e diminuição do clearance de insulina (FONTES, 2003; GREENFIELD; CAMPBELL, 2004; MANCO; CALVANI; MINGRONE, 2004; MACHANN et al., 2004).

Quanto às alterações metabólicas, o teste de tolerância à glicose mostrou que os ratos superalimentados, tanto machos quanto fêmeas, apresentavam intolerância à glicose em 30 minutos após a infusão de glicose. Sugere-se que esses resultados sejam decorrentes da resistência a insulina, comprovada no teste de tolerância intraperitoneal à insulina. Estudos anteriores demonstraram que ratos criados em ninhada pequena, aos 90 dias de idade, apresentavam menor conteúdo de IRS-1, fosfatidilinositol 3-quinase e GLUT-4. Boullu - Ciocca et al. (2005) demonstraram, no mesmo modelo experimental, níveis mais elevados de glicose, de insulina e intolerância a glicose aos 120 dias de idade. Portanto, nossos dados, corroborando

com outros, indicam que as alterações programadas no tecido adiposo e possivelmente em outros tecidos, induzidas por superalimentação pós-parto, podem provocar um desequilíbrio da homeostase da glicose mais tardiamente na vida.

A avaliação dos níveis hormonais demonstrou que os níveis plasmáticos de leptina foram maiores nos animais criados em ninhadas pequenas, resultado consistente com o aumento da adiposidade. Este quadro de resistência à leptina que se estabelece em animais NR pode ser decorrente da resistência hipotalâmica a ação anorexigênica deste hormônio, devido ao prejuízo no seu transporte pela barreira hematoencefálica ou anormalidades nos receptores e/ou na sinalização pós-receptor (JEQUIER, 2002). Hiperleptinemia associada à hiperfagia e obesidade indicam resistência a leptina e pode estar relacionada à gênese da obesidade (AHIMA et al., 2000; AHIMA; OSEI, 2004). É descrita uma associação entre resistência a leptina e resistência a insulina, devido ao *cross-talking* nas vias de sinalização de insulina e leptina, em especial no aumento da SOCS3 (Supressor de Sinalização de Citocinas 3), que bloqueia a fosforização da JAK2, segundo mensageiro da via de sinalização da leptina e também da PI3K, enzima importante na via de sinalização de insulina (HOWARD; FLIER, 2006). Assim, há bloqueio da sinalização de ambas as vias e tais hormônios deixam de exercer seu papel com eficácia.

Considerando a relação entre o tecido adiposo e resistência à insulina, foram analisados os níveis de adiponectina no plasma. Curiosamente, apesar da maior massa de gordura corporal, os níveis de adiponectina não diferiram entre os grupos no período do estudo. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram níveis normais de adiponectina nos animais NR aos 120 dias de idade (VELKOSKA; COLE; MORRIS et al., 2005) e aos 180 dias (RODRIGUES et al., 2011). No entanto, Boullu-Ciocca et al. (2008) relataram hipoadiponectinemia em ratos submetidos a superalimentação pós-natal aos 150 dias de idade. Até o momento, raros são os estudos que mostraram o nível de adiponectina em ratos criados em NR aos 60 dias de idade e os dados encontrados nos animais NR jovens ainda são controversos (VELKOSKA et al., 2005; BOULLU-CIOCCA et al., 2008).

Em resumo, a superalimentação neonatal induz ao excesso de peso, hiperfagia, massa de gordura visceral total elevada, dislipidemia, bem como a resistência à leptina e insulina na idade adulta. Portanto, nossos resultados mostram

que disfunções metabólicas e endócrinas na vida adulta, como a síndrome metabólica e diabetes, podem ter origens no ambiente nutricional do início da vida.

Nesse estudo foi demonstrado que as alterações no ambiente nutricional neonatal podem alterar não apenas o peso corporal na idade adulta, mas também comportamentos de ansiedade e medo. No que se deve às respostas comportamentais dos filhotes criados em ninhada reduzida, estes apresentaram redução de comportamentos relacionados à ansiedade e ao medo.

Com efeito, este estudo demonstrou que animais NR mostraram sinais de ansiedade reduzidos, em comparação com grandes ninhadas, demonstrados por uma maior exploração das áreas centrais no campo aberto, efeito anti-tigmotático aumentado (que prediz a ação ansiolítica) e menor tempo de *freezing* no teste de medo condicionado ao contexto, tanto em filhotes machos quanto em fêmeas na fase adulta.

Uma explicação adicional para a redução de comportamentos de ansiedade, como observado em nossos ratos criados em ninhadas pequenas, pode ser o grau de atenção materna que receberam durante o período neonatal. Além de ter reduzido a competição pela comida, os ratos criados em ninhadas de apenas três animais também tiveram redução da concorrência pela atenção materna.

É conhecido que a atenção materna pode ter promovido efeitos em longo prazo sobre o animal, com proles de mães que receberam cuidado materno mais intenso, de maneira especial a lambida, apresentando redução em manifestações comportamentais de medo e redução das respostas do eixo HHA ao estresse (LIU et al., 1997; CALDJI et al., 1998; FRANCIS et al., 1999). Curiosamente, os ratos criados por mães *high licking* (muito lambedoras) apresentam maior exploração em novos ambientes (CALDJI et al., 1998, BEERY; FRANCIS, 2011). É possível, por conseguinte, que a atenção materna tenha contribuído para os nossos resultados em ratos criados em pequenas ninhadas, sobretudo pelo aumento do tempo de lambida. Assim, nossos dados confirmam que alterações no cuidado maternal como, por exemplo, uma redução no tempo de lambida nos filhotes, pode influenciar nas respostas comportamentais e neuroendócrinas dos filhotes na fase adulta (FRANCIS et al., 2000; SPENCER; TILBROOK, 2009).

Quanto ao teste de medo condicionado ao contexto, os animais de NR apresentaram resposta reduzida, quando comparados aos de ninhada normal. Essas alterações na responsividade também pode ser atribuída às alterações no

comportamento materno acentuado em mães de NR. De acordo com a literatura, estudos demonstraram que os filhotes de mães *high licking* são hiporresponsivos ao medo no *probe-burying test* quando comparados com aqueles de mães “*low licking*” (classificação dada às mães que lambem menos sua prole). Esses mesmos autores verificaram que filhotes de mães *high licking* submetidos ao choque tiveram um aumento na expressão de c-Fos em diversas estruturas límbicas relacionadas à redução do medo. Tem sido proposto que o comportamento de lambida das mães nos filhotes modifica circuitos neurais que estão associados com redução do medo tornando-os hiporresponsivos durante a fase adulta (MENARD et al., 2004).

Por fim, consideramos que a alteração na disponibilidade e/ou qualidade da alimentação no aleitamento, bem como a interferência do cuidado materno relacionam-se com desenvolvimento dos filhotes e merecem investigações mais detalhadas, tendo em vista a vulnerabilidade desse período às influências ambientais e nutricionais que podem predispor ao aumento de tecido adiposo, peso, dislipidemias, bem como às alterações metabólicas e endócrinas que podem perdurar até a fase adulta. Estes estudos poderão auxiliar na compreensão de mecanismos que possam atenuar essas alterações e possivelmente estabelecer mecanismos fisiopatológicos que abrirão novos caminhos profiláticos e/ou terapêuticos na prevenção e no combate da obesidade e de suas consequências.

6 CONCLUSÃO

A redução de ninhada acentua o cuidado materno, eleva o cuidado com a prole e acentua a ansiólise e agressividade maternas em ratas lactantes. Este ambiente materno proporcionado pela redução no tamanho da ninhada é fundamental para o desenvolvimento de obesidade, dislipidemia, disfunções no metabolismo de glicose e hiperleptinemia, além de menor responsividade ao medo e à ansiedade na prole adulta.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R.; OSEI, S. Y. Leptin and appetite control in lipodystrophy. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n. 9, p. 4254- 4257, 2004.
- AHIMA, R. S. et al. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Front Neuroendocr**, v. 21, n. 3, p. 263- 307, 2000.
- ALBERT, J.; WALSH, M. L. Aggression in the lactating female rat: the normal decline is not dependent on the physical development of the pups. **Physiology & Behavior**, v. 58, n. 3, p. 477-481, 1995.
- ALVES, J. G. B. et al. **Pediatria**. Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP). 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- BARKER, D. J. P. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, p. 588S-595S, 2004.
- BARROSO, S. G.; ABREU, V. G.; FRANCISCHETTI, E. A. The adipose tissue in the genesis of hypertension and atherosclerotic cardiovascular disease. An emerging concept. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n. 6, p. 618- 630, 2002.
- BEERY, A. K.; FRANCIS, D. D. Adaptive significance of natural variations in maternal care in rats: A translational perspective. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1552-1561, 2011.
- BELFIORE, F.; IANNELLO, S. Insulin resistance in obesity: metabolisc mechanisms and measurement methods. **Mol Gen Metab**, v. 65, n. 2, p. 121- 128, 1998.
- BIAGINI, G. et al. Postnatal maternal separation during the stress hiporresponsive periods enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, p. 187-197, 1998.
- BIRKE, L. I. A; SADLER, D. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. **Developmental Psychobiology**, v. 20, p. 85-99, 1987.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. **Neuroscience Biobehavioral Review**, v. 14, p. 455-462, 1991.
- BONOMO, I.T. et al. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. **Hormone and metabolic research**, v. 37, p. 220–225, 2005.
- BOSCH, O. J.; NEUMANN, I. D. Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, p. 17139–17144, 2008.

BOSCH, O. J. et al. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **Journal of Neuroscience**, v. 20; 25, n.29, p. 6807-6815, 2005.

BOSCH, O. J. et al. Maternal Behaviour is Associated with Vasopressin Release in the Medial Preoptic Area and Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the Rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 5, p. 420-429, 2010.

BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 54, p. 197-203, 2005.

BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. **Diabetes**, v. 57, p. 669–677, 2008.

BOURET, S. G. Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. **Forum of nutrition**, v. 63, p. 84-93, 2010.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science**, v. 304, p. 108-110, 2004.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. **Clinical genetics**, v. 70, p. 295-301, 2006.

BRAIN, P. F. Differentiating types of attack and defensive in rodents. **Multidisciplinary Approaches to Aggression Research Amsterdam**, Elsevier, p. 53-78, 1981.

BREIER, B. H. et al. Fetal programming of appetite and obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 185, n. 1-2, p. 73-79, 2001.

CALDJ, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 9, p. 5335-40, 1998.

CAMERON, N. M. et al. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 843-865, 2005.

CARNEIRO, G. et al. Influence of body fat distribution on the prevalence of arterial hypertension and other cardiovascular risk factors in obese patients. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, p. 306-311, 2003.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CATERSON, I. D.; GILL, T. P. Obesity: epidemiology and possible prevention. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 16, n. 4, p. 595-610, 2002.

CHAMPAGNE, A. F. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiol Behav**, v. 79, p. 359–371, 2003.

CHOMTHO, S. et al. Associations between birth weight and later body composition: evidence from the 4-component model. **Am J Clin Nutr**, v. 88, p. 1040-1048, 2008.

CONCEIÇÃO, E. P. et al. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. **Hormone and metabolic research**, v. 43, p. 513–516, 2011.

CONSIGLIO, A. R. et al. Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bed nucleus of stria terminalis on maternal aggressive behavior in rats. **Physiol Behav**, v. 85, p. 354–362, 2005.

CONSIGLIO, A. R.; BRIDGES, R. S. Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. **Behav Brain Res**, v. 197, p. 97–102, 2009.

CUMMINGS, D. E. et al. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. **American journal of physiology**, v. 287, p. e297–304, 2004.

CUNHA, A. C. et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 20, p. 435-442, 2009.

DÂMASO, A. et al. Etiologia da obesidade. In: DÂMASO, A. et al. **Obesidade**. São Paulo: MEDSI, p. 3-15, 2003.

DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. **The European journal of neuroscience**, v. 18, p. 613–621, 2003.

DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. **Regulatory peptides**, v. 108, p. 103–111, 2002.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. **Neuroreport**, v. 11, p. 2795–2798, 2000.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. **Neuroreport**, v. 12, p. 3201–3204. 2001.

DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. Neonatal programming of neuroimmunomodulation - role of adipocytokines and neuropeptides.

Neuroimmunomodulation, v. 15, p. 176-188, 2008.

DE MOURA, R. F. et al. Metabolic syndrome signs in wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **The British journal of nutrition**, v. 101, n. 8, p. 1178-1184, 2009.

DE OLIVEIRA CRAVO, C. et al. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. **Hormone and metabolic research**, v. 34, p. 400-405, 2002.

DIETZ, W. H. Critical periods in childhood for the development of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 59, p. 955–959, 1994.

DUTRA, S. C. et al. Cold exposure restores the decrease in leptin receptors (OB-Rb) caused by neonatal leptin treatment in 30-day-old rats. **The Journal of endocrinology**, v. 195, p. 351-358, 2007.

EGAWA, M.; YOSHIMATSU, H.; BRAY, G. A. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. **The American journal of physiology**, v. 260, p. R328–R334, 1991.

FEDERENKO, L. S.; WADHWA, P. D. Women's mental health during pregnancy influences fetal and infant developmental and health outcomes. **CNS Spectr**, v. 9, p. 198-206, 2004.

FERNANDEZ, C. M. et al. The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. **Metabolism**, v. 58, n. 2, p. 204-211, 2009.

FERREIRA, A. S. et al. Minor, Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. **Behav Neurosci**, v. 103, p. 193–203, 1989.

FERREIRA, A. et al. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 197-204, 2002.

FERRETTI, S. et al. Developmental overfeeding alters hypothalamic neuropeptide mRNA levels and response to a high-fat diet in adult mice. **Peptides**, v. 32, p. 1371–1383, 2011.

FIGUEIREDO, M. S. et al. Flaxseed supplementation of rats during lactation changes the adiposity and glucose homeostasis of their offspring. **Life Sciences**, v. 85, p. 365-371, 2009.

FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterization of phenomenon of 'one-trial tolerance' to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 102, p. 98–101, 1990.

- FILE, S. E. Factores controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 125, p. 151-157, 2001.
- FIOROTTO, M. L. et al. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. **Am J Physiol**, v. 260, n. 6 Pt 2, p. R1104-1113, 1991.
- FLEMING, A. S.; WALSH, C. Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, p. 429-443, 1994.
- FLEMING, A. S.; LUEBKE, C. Timidity prevents the nulliparous female from being a good mother. **Physiol Behav**, n. 27, p. 863-868, 1981.
- FLEMING, A. S.; ROSENBLATT, J. S. Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. **J Comp Physiol Psychol**, v. 86, p. 221-232, 1974.
- FONTES, C. F. L. Diabetes. *In.*: POIAN, A.T.; CARVALHO-ALVES, P.C. **Hormônios e Metabolismo** – Integração e Correlações Clínicas. 1 ed. São Paulo: Atheneu, p. 215-268, 2003.
- FRANCIS, D. D. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, p. 1145-1148, 2000.
- FRANCIS, D. D. et al. Nongenomic transmission across generations in maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, p. 1155-1158, 1999.
- FREEDMAN, D. S. et al. The Relation of Overweight to Cardiovascular Risk Factors Among Children and Adolescents: The Bogalusa Heart Study. **Pediatrics**, v. 103, n. 6, p. 1175-1182, 1999.
- FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502, 1972.
- FRIES, A. B. W. et al. Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating social behavior. **PNAS**, v. 102, n. 47, p. 17237-17240, 2005.
- GANS, S. E.; MCCLINTOCK, M. K. Individual differences among female rats in the timing of the preovulatory LH surge are predicted by lordosis reflex intensity. **Hormones and Behavior**, v. 7, p. 403-417, 1993.
- GIOVENARDI, M. et al. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 1083-1088, 2000.
- GIOVENARD, M. et al. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology and Behavior**, v. 86, p. 209-217, 2005.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v. 305, p. 1733–1736, 2004.

GREENFIELD, J. R.; CAMPBELL, L. V. Insulin resistance and obesity. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 289-285, 2004.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**, v. 17, p. 722-729, 1969.

GROTA, L. J.; ADER, R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. **Hormones and Behavior**, v. 5, n. 4, p. 275-282, 1974.

GUBERNICK, D. J.; ALBERTS, J. R. Maternal licking by virgin and lactating rats: water transfer from pups. **Physiology & Behavior**, v. 34, p. 501-506, 1985.

GUEDES, D. P. et al. Dispendio energético diário e níveis de lipídeos-lipoproteínas plasmáticos em adolescentes. **Bras Med Esporte**, v. 13, n. 2, p. 123-128, 2007.

GUERRERO-ROMERO, F. et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, p. 3347–3351, 2010.

GUTTELING, B. M. et al. The effects of prenatal stress on temperament and problem behavior of 27-month-old toddlers. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, v. 14, p. 41-51, 2005.

HABBOUT, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **J Nutr**, v. 143, p. 553–562, 2013.

HAHN, P. Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. **J Nutr**, v. 114, n. 7, p. 1231-1234, 1984.

HALL, J. E.; HILDEBRANDT, D. A.; KUO, J. Obesity hypertension: Role of leptin and sympathetic nervous system. **American journal of hypertension**, v. 14, p. 103S-115S, 2001.

HAMDY, O.; PORRAMATIKUL, S.; AL-OZAIRI, E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. **Curr Diabetes Rev**, v. 2, n. 4, p. 367-373, 2006.

HANSEN, S.; FERREIRA, A. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. **Behav Neurosci**, v. 100, n. 1, p. 64-70. 1986.

HOU, M. et al. Neonatal Overfeeding Induced by Small Litter Rearing Causes Altered Glucocorticoid Metabolism in Rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e25726, 2011.

HOWARD, J. K.; FLIER, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends Endocrinol Metab**, v. 17, n. 9, p. 365-371, 2006.

HUNTINGFORD, F. A. Animals fight but do not make war. In: Groebel, J., Hinde, R. A. Aggression and war – their biological and social bases. **Cambridge University Press**, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamento Familiar 2008 e 2009**.

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf> Acesso em : 03 dez. 2013

INSEL, T. R.; WINSLOW, J. T. Serotonin and Neuropeptides in Affiliative Behaviors. **Biol Psych**, v. 44, p. 207-219, 1998.

JANS, J. E., LEON, M. The effects of lactation and ambient temperature on the body temperature of female norway rats. **Physiology & Behavior**, v. 30, p. 959-961, 1983.

JÉQUIER, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. **Ann N Y Acad Sci**, v. 967, p. 379-388, 2002.

KITAGAWA, S. et al. Effect of intracerebroventricular injections of prolactin-releasing peptide on prolactin release and stress-related responses in steers. **Animal Science Journal**, v. 82, p. 314–319, 2011.

KRAEMER, G. W. A psychobiological theory of attachment. **Behav Brain Sci**, v. 15, p. 493-541, 1992.

LACLAUSTRA, M.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J. M. Metabolic syndrome pathophysiology: The role of adipose tissue. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 17, p. 125–139, 2007.

LEHMANN, M. L.; ERSKINE, M. S. Induction of pseudopregnancy using artificial VCS: Importance of lordosis intensity and prestimulus estrous cycle length. **Hormones and Behavior**, v. 45, p. 75-83, 2004.

LEIBOWITZ, S.F.; WORTLEY, K.E. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 473-504, 2004.

LEON, M. et al. Diurnal cycle of mother-young contact in norway rats. **Physiology & Behavior**, v. 32, p. 999-1003, 1984.

LEON, M.; CROSKERRY, P. G.; SMITH, G. K. Thermal control of mother-young contacts in rats. **Physiology and Behavior**, v. 21, p. 793-811, 1978.

LEVIN, R. E.; ROUTH, V. H. Role of the brain in energy balance and Obesity. **Am J Physiol**, v. 271, n. 40, p. R491-500, 1996.

LI, Y.; PLAGEMANN, A.; DAVIDOWA, H. Increased inhibition by agouti-related peptide of ventromedial hypothalamic neurons in rats overweight due to early postnatal overfeeding. **Neuroscience letters**, v. 330, p. 33–36, 2002.

- LISBOA, S. F. et al. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, p. 1163-1173, 2010.
- LIU, D. et al. Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. **Science**, v. 277, p. 1659, 1997.
- LIVINGSTONE, D. E.; KENYON, C. J.; WALKER, B. R. Mechanisms of dysregulation of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats. **J Endocrinol**, v. 167, n. 3, p. 533-539, 2000.
- LONSTEIN, J. S.; GAMMIE S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 8, p. 869-888, 2002.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Foundation symposium**, v. 156, p. 38-50, 1991.
- MACHANN, J. et al. Intramyocellular lipids and insulin resistance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 6, p. 239-248, 2004.
- MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 6, p. 402-413, 2004.
- MANTZOROS, C. S. The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. **Ann Intern Med**, v. 130, p. 671-680, 1999.
- MARSH, A. J. et al. Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus. **Hypertension**, v. 42, p. 488-493, 2003.
- MARTINS, M. R. et al. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. **Journal of Endocrinology**, v. 198, p. 591-598, 2008.
- MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell functions from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985.
- MATTSON, B. J. et al. Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. **Behav Neurosci**, v. 115, p. 683-694, 2001.
- MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MUHLHAUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **J Physiol**, v. 565, p. 9-17, 2005.
- MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 1161-1192, 2001.

- MEANEY, M. J., BRAKE, W.; GRATTON, A. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 1-2, p. 127-138, 2002.
- MENARD, J. L.; CHAMPAGNE, D. L.; MEANEY, M. J. P. Variations of maternal care differentially influence 'fear' reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 297-308, 2004.
- MOLES, A., KIEFFER, B. L., D'AMATO, F. R. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. **Science**, v. 304, p. 1983-1986, 2004.
- MOORE, C. L.; POWER, K. L. Variations in maternal care and individual differences in play, exploration and grooming of juvenile Norway rat offspring. **Developmental Psychobiology**, v. 25, p. 165-182, 1992.
- MOREIRA, A. S. et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**, v. 19, p. 805-810, 2009.
- MORICEAU, S.; SULLIVAN, R. M. Neurobiology of Infant Attachment. **Dev Psychobiol**, v. 47, p. 230-242, 2005.
- MORRIS, M. J. Cardiovascular and metabolic effects of obesity. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 35, p. 416-9, 2008.
- MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. F. Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 176-188, 2008.
- MOZES, S. et al. Obesity and changes of alkaline phosphatase activity in the small intestine of 40 - and 80-day-old rats subjected to early postnatal overfeeding or monosodium glutamate. **Physiol Res**, v. 53, n. 2, p. 177-186, 2004.
- NASCIMENTO, A. F. et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 6, p. 968-974, 2008.
- NEUMANN, I. D. Brain Oxytocin, A key regulator of emotional and social behaviours in both females and males, **J Neuroendocrinol**, v. 6, p. 858–865, 2008.
- NUMAN, M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 397, p. 19-28, 1994.
- OGAWA, T. et al. Periodic maternal deprivation alters response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field induced behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 4, p. 961-967, 1994.

OLIVEIRA, E. et al. Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. **The Journal of endocrinology**, v. 205, p. 159-170, 2010.

OOMURA, Y. Glucose as a regulator of neuronal activity. **Adv Metab Disord**, v. 10, p. 31–65, 1983.

PASSOS, M.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition research**, v. 20, p. 1603–1612, 2000.

PAUK, J. et al. Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups. **Life Sciences**, v. 39, n. 22, p. 2081-2087, 1986.

PEDERSEN, A., BOCCIA, M. L. Oxytocin Links Mothering Received, Mothering Bestowed and Adult Stress Responses. **Stress**, v. 5, n. 4, p. 259-267, 2002.

PEKARY, A. E.; SATTIN, A.; BLOOD, J. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide release in rat brain and peripheral tissues by leptin. **Brain research**, v. 1345, p. 9-18, 2010.

PEREIRA, R. et al. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signalling cascade in rats heart's. **Regulatory Peptides**, v. 136, p. 117-121, 2006.

PINTO, S. et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. **Science**, v. 304, p. 110-115, 2004.

PLAGEMANN, A. et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v.11, p. 541–546, 1999a.

PLAGEMANN, A. et al. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. **Developmental neuroscience**, v. 21, p. 58–67, 1999b.

PLAGEMANN, A. et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **Journal of perinatal medicine**, v. 38, p. 393-400, 2010.

POIRIER, P. et al. Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: An update of the American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. **Circulation**, v. 113, p. 898-918, 2006

PREIS, S. R. et al. Neck circumference as a novel measure of cardiometabolic risk: The Framingham Heart Study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 8, p. 3701-3710, 2010.

PRIESTNALL, R. Effects of litter size on the behaviour of lactating Female mice (*mus musculus*). **Anim Behav**, v. 20, p. 386-394, 1972.

PRYCE, C. R. et al. Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 1, p. 71-83, 2001.

PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 57-71, 2003.

RAJIA, S.; CHEN, H.; MORRIS, W. J. Maternal Overnutrition Impacts Offspring Adiposity and Brain Appetite Markers-Modulation by Postweaning Diet. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, p. 905–914, 2010.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**, v. 295, n. 7, p. 349-353, 1976.

REILLY, J. J.; KELLY, J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. **International Journal of Obesity**, v. 35, p. 891-898, 2011.

RIBEIRO-FILHO, F. F. et al. Visceral fat and metabolic syndrome: more than a simple association . **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 230-238, 2006.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, p. 109-117, 2011.

RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **The Journal of endocrinology**, v. 195, p. 485–494, 2007.

ROSENBLATT, J. S. Hormonal and nonhormonal regulation of maternal behavior: a theoretical survey. **Reprod Nutr Dev**, v. 20, n. 3B, p. 791-800, 1980.

SANTOS-SILVA, A. P. et al. Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. **Life sciences**, v. 87, p. 187-195, 2010.

SCHANBERG, S. M.; KUHN, C. M. Maternal deprivation: an animal model of psychosocial dwarfism. *In.*: Enzymes and neurotransmitters in mental disease (USDIN, E.; SOURKES, T., eds), p. 373-395. **Chichester: Wiley**, 1980.

SCHELSTRAETE, I. et al. Maternal behavior in the wistar rat under atypical zeitgeber. **Physiology & Behavior**, v. 52, p. 189-193, 1992.

SCHWARTZ, M. W. et al. Identification of leptin action in rat hypothalamus. **J Clin Invest**, v. 98, p. 1101-1106, 1996.

- SEITZ, P. F. D. The maternal instinct in animal subjects. **Psychosom Med**, v. 20, p. 215-226, 1958.
- SHANKAR, K. et al. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 294, n. 2, p. 28-38, 2008.
- SICHERI, R.; SIQUEIRA, K. S.; MOURA, A. S. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. **Int J Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 24, p. 614-618, 2000.
- SMITH, M. A. et al. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. **Endocrinology**, v. 138, p. 4622-4628, 1997.
- SOARES, V. M.; GARCIA-SOUZA, E. P.; LACERDA-MIRANDA, G.; MOURA, A. S. Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1a signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice. **Regulatory peptides**, v. 174, p. 6-11, 2012.
- SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 1133-1143, 2009.
- STANNER, S. A. et al. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. **British medical journal**, v. 315, p. 1342-1348, 1997.
- STERN, J. M.; JOHNSON, S. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 993-1011, 1990.
- STERN, J. M.; YU, Y. L.; CROCKETT, D. P. Dorsolateral columns of the spinal cord are necessary for both suckling-induced neuroendocrine reflexes and the kyphotic nursing posture in lactating rats. **Brain Research**, v. 947, p. 110-121, 2002.
- STOLAR, M. Metabolic syndrome: Controversial but useful. **Cleve Clin J Med**, v. 74, p. 199-202, 205-208, 2007.
- STRAUSSMAN, R. et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. **Nature structural & molecular biology**, v. 16, p. 564-571, 2009.
- SUCHECKI, D. et al. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. **Psychoneuroendocr**, v. 20, p. 169-182, 1995.
- SYMONDS, M. E. et al. Nutritional programming of the metabolic syndrome. Nature reviews. **Endocrinology**, v. 5, p. 604-610, 2009.
- THOMPSON, N. M. et al. Prenatal and postnatal pathways to obesity: different underlying mechanisms, different metabolic outcomes. **Endocrinology**, v. 148, p. 2345-2354, 2007.

TOSTE, F. P. et al. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. **The British journal of nutrition**, v. 95, p. 830-837, 2006.

TREVENZOLI, I. H. et al. Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. **American journal of physiology, Endocrinology and metabolism**, v. 298, n. 5, p. e941-949, 2010a.

TREVENZOLI, I. H. et al. Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. **Hormone and metabolic research**, v. 42, p. 483-490, 2010b.

TROINA, A. A. et al. Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the offspring body composition, lipid profile and sexual function. **Food Chemistry Toxicology**, v. 48, p. 697-703, 2010.

URIARTE, N. et al. Effects of Maternal Care on the Development, Emotionality, and Reproductive Functions in Male and Female Rats. **Developmental Psychobiology**, v. 49, p. 451-462, 2007.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v. 83, n. 1, p. 103-111, 1970.

VAN OERS, H. J. J. et al. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress makes is reversed by tactile stimulation and feeding but not y suppressing corticosterone. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 10171-10179, 1998.

VAZQUEZ, D. M. et al. Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat. **Brain Res**, v. 731, p. 79-90, 1996.

VEIGA, C. P. et al. Effect of 5-HT_{1B} receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 825-830, 2007.

VELKOSKA, E.; COLE, T. J.; MORRIS, M. J. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, p. e1236-1243, 2005.

VICKERS, M. H. et al. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. **Endocrinology**, v. 149, p. 1906-1913, 2008.

VILLANUEVA, E. C.; MYERS, M. G. Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. **The International Journal of Obesity**, v. 32, p. S8-12, 2008.

WALKER, C. D. et al. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Rev Psychiatr Neurosci**, v. 29, p. 364-382, 2004.

WATERLAND, R. A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **Am J Clin Nutr**, v. 69, p. 179–197, 1999.

WATSON, J. B. et al. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. **Dev Psychopathol**, v. 11, p. 457-466, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Fact Files: tem facts on obesity**.

Geneva. 2012a. Disponível em:

<<http://www.who.int/features/facfiles/obesity/facts/en/index.html>>. Acesso em 03 dez. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategy on diet, physical**

activity an health. Obesity an Overweight. 2012b. Disponível em:

<<http://www.who.int/dietphysicalactivity/media/en/>>. Acesso em 03 dez.2012.

WILKINS, A. S.; LOGAN, M.; KEHOE, P. Postnatal Pup Brain Dopamine Depletion Inhibits Maternal Behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, p. 867-873, 1997.

YURA, S. et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. **Cell metabolism**, v. 1, p. 371-378, 2005.

YOUNG, J. B. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 279, p. R1745-52, 2000.

YOUNG, L. J. et al. Gene targeting approaches to neuroendocrinology: oxytocin, maternal behavior, and affiliation. **Horm Behav**, v. 31, p. 221-231, 1997.