

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA
E DO ADOLESCENTE

**INFLUÊNCIA DA MANIPULAÇÃO NEONATAL
SOBRE ALTERAÇÕES METABÓLICAS E
NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO
CRÔNICA À DIETA PALATÁVEL NA VIDA ADULTA**

TESE DE DOUTORADO

CARLA DA SILVA BENETTI

Porto Alegre, Brasil, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA
E DO ADOLESCENTE

**INFLUÊNCIA DA MANIPULAÇÃO NEONATAL
SOBRE ALTERAÇÕES METABÓLICAS E
NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO
CRÔNICA À DIETA PALATÁVEL NA VIDA ADULTA**

CARLA DA SILVA BENETTI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zubaran Goldani

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Dalmaz

**Co-orientador estágio de doutorado no exterior: Prof.
Michael Meaney (McGill University, Montreal, Canadá)**

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

15/09/2010

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Alexandre A. Ferraro

Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Fernanda Urruth Fontella

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

B465i Benetti, Carla da Silva

Influência da manipulação neonatal sobre alterações metabólicas e neuroquímicas induzidas pela exposição crônica à dieta palatável na vida adulta / Carla da Silva Benetti; orient. Marcelo Zubaran Goldani; co-orient. Carlaz Dalmaz. – 2010.

237 f.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Dieta 2. Recém-nascido 3. Metabolismo 4. Gorduras na dieta 5. Modelos animais I. Goldani, Marcelo Zubaran II. Dalmaz, Carla III. Título.

NLM: WS 130

*Dedico esta tese ao meu Orientador Prof. Marcelo Goldani,
à minha co-orientadora Prof^a. Carla Dalmaz,
à Prof^a. Patrícia Silveira e à minha família.*

AGRADECIMENTOS

Ao Marcelo, meu orientador, pela confiança, apoio, pela imensa motivação e paciência, assim como pelos ensinamentos, oportunidades, pelo exemplo de profissionalismo e pelo afeto, desde o princípio desta minha trajetória.

À Carla, minha co-orientadora, pela delicadeza, sensibilidade e carinho, pela atenção e disponibilidade, sempre vibrando a cada novo achado e incentivando novas idéias. Agradeço também pelo aprendizado e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório 37 (Departamento de Bioquímica) pelo companheirismo, pela disponibilidade para discussão de novos trabalhos, alegria e amizade.

Aos meus pais, Sílvia e Carlos, e à minha irmã, Cátia, pelo amor, carinho, pela compreensão nos momentos de estresse e pelo apoio na superação das dificuldades.

Ao Roger, pelo amor, estímulo, companheirismo e atenção, e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Aos meus queridos amigos Prof^ª. Patrícia e André pelo carinho, incentivo, pela disponibilidade, pelas oportunidades, pelos ensinamentos e pela excelente parceria de trabalho.

À Universidade (UFRGS), ao Programa de Pós-Graduação (PPGSCA) e ao Departamento de Bioquímica pela oportunidade.

Ao CNPq e a CAPES por viabilizarem este trabalho e especialmente pela concessão de minha bolsa de Doutorado no país bem como no exterior.

RESUMO

Estudos prévios demonstram que intervenções precoces levam a alterações comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta. Nossos achados anteriores demonstram que animais manipulados no período neonatal consomem mais alimento palatável na vida adulta e apresentam um menor aumento do depósito de gordura abdominal, após exposição crônica a dieta palatável (chocolate) em relação aos animais intactos. Neste trabalho de tese, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da manipulação neonatal sobre a preferência alimentar bem como sobre a regulação metabólica de ratas adultas. Para isso, investigamos parâmetros metabólicos e neuroquímicos em resposta à exposição crônica a uma dieta hipercalórica e palatável, assim como a um período de abstinência desse tipo de alimento em ratas fêmeas adultas expostas ou não à manipulação neonatal (10 min/dia, 10 primeiros dias de vida). A manipulação neonatal induziu maior ingestão de alimento palatável após um curto período de privação. Entretanto, o consumo durante a exposição crônica a essa dieta não diferiu entre os grupos experimentais. Também observamos que ratas fêmeas manipuladas, quando cronicamente expostas à dieta palatável na vida adulta, têm menor aumento da gordura abdominal e esse efeito persiste após a privação da dieta. Ratas não-manipuladas apresentaram níveis mais elevados de colinesterases no soro após exposição crônica a dieta palatável, entretanto, sem alterações na atividade de colinesterases no córtex cerebral. Foi identificado, após exposição crônica a dieta palatável, uma redução na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo e na amígdala e um aumento nos níveis plasmáticos de S100B em ratas não-manipuladas no período neonatal. Após as primeiras 24h de privação do alimento palatável, ratas fêmeas não-manipuladas demonstraram maior frequência de sinais de abstinência (tremores de cabeça) em comparação com ratas manipuladas no período

neonatal. Assim, esses achados sugerem que a manipulação neonatal determina alterações persistentes no comportamento alimentar e previne algumas alterações periféricas e centrais induzidas pela exposição crônica a uma dieta hiperpalatável, modulando a resposta metabólica de modo a reduzir a vulnerabilidade de dano metabólico e neural.

Palavras-chave: manipulação neonatal, estresse neonatal, dieta palatável, gordura abdominal, triglicerídios, colinesterase, proteína S100B, Na⁺,K⁺-ATPase, resposta metabólica, privação de alimento palatável.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that an intervention early in life leads to behavior and neuroendocrine alterations in adulthood. According to our previous findings neonatally-handled animals have an increased consumption of palatable food, as well as a lower increase in abdominal fat accumulation after being chronically exposed to a highly palatable diet (chocolate) as compared with intact rats. In the present study, our aim was to evaluate the effects of neonatal handling on food preference and metabolic regulation in adult female rats. Therefore, we investigated metabolic and neurochemical parameters in response to a chronic exposure to a highly palatable diet, and to its withdrawal in adult female rats exposed or not to neonatal handling procedure (10 min/day, 10 first days of life). We observed an effect of neonatal handling inducing an increased palatable food intake after one week of chocolate withdrawal. However, chocolate consumption during long-term exposure to this type of diet did not differ between experimental groups. After a 30-days-period of chocolate exposure, non-handled female rats exhibited an increased abdominal fat deposition in comparison to neonatally-handled rats, and this effect persisted even after chocolate withdrawal. Non-handled rats had increased serum cholinesterase levels after chronic exposure to palatable diet, without alterations in cerebral cortex cholinesterase activity. We also observed that chocolate consumption lead to a reduced Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus and amygdala, as well as an increased plasma S100B levels in non-handled females rats. After the first 24h of chocolate withdrawal, non-handled female rats exhibited an increased frequency of head shakes, during the Open Field task, in comparison to handled rats. Therefore, these findings suggest that neonatal handling leads to persistent alterations in feeding behavior, and also prevents some peripheral and central alterations induced by chronic exposure to a highly

palatable diet; modulating the metabolic response in order to reduce the vulnerability to metabolic and neuronal damage in adulthood.

Key Words: neonatal handling, neonatal stress, palatable diet, abdominal fat deposition, triglycerides, cholinesterase activity, S100B protein, Na⁺,K⁺-ATPase activity, metabolic response, palatable food withdrawal.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico

AChE: Acetilcolinesterase

BuChE: Butirilcolinesterase

ChE: Colinesterase

GCs: Glicocorticóides

HPA: Hipotálamo-pituitária-adrenal

RNA: Ácido ribonucléico

SNC: Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 EVENTOS PRECOSES E ALTERAÇÕES ENDÓCRINO-METABÓLICAS NA VIDA ADULTA.....	14
2.2 CUIDADO MATERNO	17
2.3 EVENTOS PRECOSES E ALTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	19
2.4 EFEITOS DO CONSUMO DE ALIMENTOS PALATÁVEIS – UMA ABORDAGEM NEUROQUÍMICA	21
2.5 ATIVIDADE DAS COLINESTERASES E RESPOSTA METABÓLICA	24
2.6 Na^+, K^+ -ATPASE E PERFIL METABÓLICO	26
2.7 PROTEÍNA S100B E RESPOSTA METABÓLICA.....	27
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVOS	30
5 HIPÓTESES DE TRABALHO	32
6 MATERIAL E MÉTODOS	33
6.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	33
6.2 MANIPULAÇÃO NEONATAL.....	35
6.3 HABITUAÇÃO AO ALIMENTO NOVO	36
6.4 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ALIMENTO PALATÁVEL NA CAIXA-MORADIA.....	36
6.5 PRIVAÇÃO DO ALIMENTO PALATÁVEL.....	37
6.6 COLETA DE SANGUE E DISSECÇÃO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS E GORDURA ABDOMINAL.....	38
6.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E NEUROQUÍMICAS	40
6.7.1 Determinação dos Níveis Plasmáticos de TGs, Níveis de Proteína S100B no Plasma e na Gordura Abdominal	40
6.7.2 Determinação da Atividade das Colinesterases no Soro e Córtex Cerebral	41
6.7.3 Determinação da Atividade da Na^+, K^+-ATPase no Hipocampo e Amígdala	41
6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO: ARTIGOS ORIGINAIS.....	68
7.1 SEÇÃO I – ARTIGO 1.....	68
7.2 SEÇÃO II – ARTIGO 2.....	149
7.3 SEÇÃO III – EXPERIMENTOS ADICIONAIS.....	213
7.3.1 Materiais e Métodos.....	213
7.3.1.1 Animais Experimentais.....	213
7.3.1.2 Observação dos Cuidados Maternais.....	214
7.3.1.3 Exposição Crônica à Dieta Rica em Gordura.....	215
7.3.1.4 Coleta de Sangue e Dissecção da Gordura Abdominal.....	216
7.3.1.5 Medidas Bioquímicas.....	217
7.3.2 Resultados.....	217
7.3.2.1 Consumo de Dieta Rica em Gordura.....	217
7.3.2.2 Peso Corporal.....	218
7.3.2.3 Ganho de Peso.....	220
7.3.2.4 Gordura Abdominal.....	221
7.3.2.5 Medidas Bioquímicas.....	222
7.3.2.6 Níveis de Glicose no Plasma.....	222
7.3.2.7 Níveis Plasmáticos de Insulina.....	224
8 DISCUSSÃO GERAL.....	227
9 CONCLUSÕES.....	237

1 INTRODUÇÃO

Desde meados da década de 30, os estudos epidemiológicos vêm demonstrando o impacto das condições ambientais precoces no padrão de saúde e doença dos indivíduos (KERMACK *et al.*, 1934). Tais investigações estenderam-se ao longo das décadas seguintes demonstrando que eventos ambientais precoces determinam indivíduos biologicamente diferentes de forma persistente até a vida adulta (BARKER *et al.*, 1989), gerando assim a “Hipótese do Fenótipo Pougador” (*Thrifty Phenotype Hypothesis*) e a expressão “Programação”. A primeira propõe que o feto se adapta a um ambiente intra-uterino adverso otimizando o uso de um suprimento energético reduzido para garantir a sobrevivência, contudo, favorecendo o desenvolvimento de alguns órgãos em sacrifício de outros (HALES, BARKER, 1992). A segunda se refere ao conceito de que uma lesão ou estímulo aplicado num período crítico ou sensível pode ter efeitos duradouros ou persistentes sobre a estrutura ou função de um organismo (LUCAS, 1991). Reunindo as informações desses dois grupos (Barker e Lucas), assim como dos estudos anteriores e subsequentes de diversos outros centros de pesquisa em todo o mundo, formulou-se a teoria Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (*Developmental Origins of Adult Health and Disease, DOHaD* – GLUCKMAN, HANSON, 2004). Dedicado a estudar as associações e mecanismos que levam o ambiente precoce a gerar maior risco para doenças na vida adulta, esse novo e relevante campo de pesquisa vem produzindo conhecimento e contribuindo efetivamente para a área da Pediatria, assim como para áreas afins, dentre elas a Nutrição.

No contexto dos estudos experimentais, a manipulação neonatal consiste em um modelo adequado de intervenção ambiental precoce para avaliar seu impacto sobre os diferentes desfechos comportamentais e endócrino-metabólicos na idade adulta. Esse

protocolo de separação da mãe por curtos períodos durante os primeiros dias de vida foi inicialmente proposto por Levine e colaboradores em 1957. Esses autores foram os pioneiros a relatar que o ambiente precoce tem efeitos fisiológicos e comportamentais persistentes, induzindo uma maior atividade e exploração de um local desconhecido (na tarefa de campo aberto, por exemplo), bem como uma menor reatividade a situações de estresse nesses animais adultos manipulados no período neonatal. Estudos subsequentes aos de Levine, descreveram a relevância da interação mãe-filhote durante os primeiros dias de vida e evidenciaram os efeitos neuroendócrinos determinados por esse contato, o qual foi descrito por modular a atividade pituitária-adrenal em resposta a um estímulo precoce (SMOTHERMAN, 1983). Alguns anos depois, por volta do final da década de 90, pesquisadores canadenses se dedicaram a investigar o impacto da manipulação precoce sobre a resposta de ansiedade e a resposta apetitiva, efeitos anteriormente não estudados. Eles observaram que animais manipulados no período neonatal são menos ansiosos e apresentam um padrão alterado do comportamento alimentar que persiste ao longo da vida (MCINTOSH *et al.*, 1999). Esses achados são confirmados em estudos mais recentes (SILVEIRA *et al.*, 2004, 2005).

Em 1959, Harlow e Zimmermann desenvolveram um estudo com primatas separados de suas mães verdadeiras no início da vida e adotados por mães inanimadas que ofereciam conforto e nutrição. Esses estudiosos reconheceram uma forte e persistente ligação entre a mãe (mesmo que adotiva) e seu filhote e descreveram os efeitos desse contato sobre as respostas comportamentais na infância. A relação mãe-filhote também demonstrou ser fundamental para o desenvolvimento das repostas afetivas durante a infância (HARLOW e ZIMMERMANN, 1959). Seguindo essa mesma linha de pensamento, seria impossível descrever os efeitos da interação mãe-filhote sem abordar o cuidado materno, personagem principal dessa relação. Variações naturais do cuidado materno contribuem para o

desenvolvimento de diferenças individuais na resposta neuroendócrina e comportamental ao estresse. Por exemplo, filhotes de mães altamente cuidadoras exibem, na vida adulta, níveis reduzidos de corticosterona no plasma após exposição ao estresse agudo, acompanhados de uma realçada sensibilidade do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides (LIU *et al.*, 1997). Adicionalmente, a prole adulta de mães com altos níveis de cuidado exibe uma reduzida resposta comportamental de medo ao estresse em comparação com a prole de mães com baixos níveis de cuidado maternal (CALDJI *et al.*, 1998). Vale ressaltar que esses efeitos das variações na interação mãe-filhote sobre a reatividade ao estresse são transmitidos para as gerações subsequentes (FRANCIS *et al.*, 1999).

As evidências de alterações na resposta neuroendócrina e comportamental ao estresse induzidas pelo cuidado materno, foram fundamentais para incentivar o desenvolvimento de novos estudos abordando a relação entre gene e ambiente (epigenética). Um dos primeiros trabalhos nessa linha de pesquisa demonstrou que a programação da resposta ao estresse na prole de mães altamente cuidadoras pode ser explicada pelo impacto do ambiente neonatal, como também pela vulnerabilidade genética (WEAVER *et al.*, 2002). Ou seja, o cuidado materno programa a função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na prole através da regulação da expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse (FISH *et al.*, 2004).

Assim, o desenvolvimento e a gravidade de diversas condições patológicas na vida adulta dependem da exposição a fatores ambientais precoces, da vulnerabilidade genética do indivíduo, assim como do período de ocorrência do evento estressor (CHARMANDARI *et al.*, 2003). Uma vez que a vida pré-natal e a infância são períodos críticos caracterizados por alta plasticidade neuronal (KHAZIPOV, LUHMANN, 2006; CREWS *et al.*, 2007), a exposição do indivíduo a um estímulo nesses períodos pode levar a alterações persistentes no funcionamento do organismo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EVENTOS PRECOSES E ALTERAÇÕES ENDÓCRINO-METABÓLICAS NA VIDA ADULTA

Conforme descrito na introdução acima, estudos avaliando crescimento e desenvolvimento infantil vêm despertando o interesse de pesquisadores, na busca de uma melhor compreensão do impacto de um evento precoce sobre a morbidade mais tarde na vida, assim como dos mecanismos envolvidos nessa relação causal.

Sabe-se que durante a vida fetal e nos primeiros tempos após o nascimento, órgãos e tecidos do corpo passam pelos chamados períodos críticos do desenvolvimento (WIDDOWSON, MCCANCE, 1975). Sendo um momento crucial e sensível do crescimento e desenvolvimento, um estímulo ou lesão imposto neste período pode prejudicar a função de uma estrutura ou ajustar um sistema fisiológico (BARKER *et al.*, 1993; LUCAS, 1994; SINGHAL, LUCAS, 2004), e ainda, os efeitos de uma lesão precoce se apresentam de forma profunda e permanente na vida adulta (LUCAS, 1991; BENEDIKTSSON *et al.*, 1993), podendo, ainda, afetar gerações subsequentes (METCALFE, MONAGHAN, 2001).

Evidências clínicas têm demonstrado associações entre eventos ocorridos durante a vida intra-uterina e alterações endócrino-metabólicas na idade adulta, incluindo maior ocorrência de diabetes do tipo II (FORSEN *et al.*, 2000), diminuída sensibilidade à insulina (SOTO, MERICQ, 2005) e maior vulnerabilidade para o desenvolvimento de obesidade abdominal (LAITINEN *et al.*, 2004). Outras investigações sugerem uma programação fetal do

metabolismo do colesterol e de lipoproteínas (DAVIES *et al.*, 2004), bem como da síndrome metabólica (KANAKA-GANTENBEIN *et al.*, 2003). Estudo recente descreveu um aumento no consumo espontâneo de carboidratos em mulheres jovens com restrição de crescimento intra-uterino (BARBIERI *et al.*, 2009). Pesquisas experimentais confirmam esses efeitos do ambiente precoce programando alterações no comportamento alimentar: hiperfagia (DESAI *et al.*, 2007) e alteração na regulação do apetite (DELAHAYE *et al.*, 2008), bem como no desenvolvimento endócrino-metabólico: disfunções na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA, LESAGE *et al.*; 2001; SECKL, 2004; JONES *et al.*; 2006) e na fisiologia metabólica (O'REGAN *et al.*, 2004). Todos esses efeitos em animais e humanos podem ser observados em períodos mais tardios da vida.

Tão importante quanto o ambiente fetal, as condições pós-natais têm um papel extremamente relevante e determinante sobre a saúde na idade adulta. Dessa forma, algumas abordagens experimentais foram desenvolvidas para estudar os efeitos de uma intervenção precoce bem como da relevante interação mãe-filhote em um período crítico do desenvolvimento. Dentre elas está a manipulação neonatal, que será enfatizada neste trabalho.

O modelo de manipulação (LEVINE *et al.*, 1967) é caracterizado por uma breve (não mais que 30 minutos), repetida e aparentemente inócua separação da mãe durante o período neonatal. Este protocolo é conhecido por produzir um aumento no cuidado materno (BRANCHI *et al.*, 2001; PRYCE *et al.*, 2001; GAROFLOS *et al.*, 2008), e tal comportamento é observado no momento em que os filhotes retornam para a caixa-moradia, após um curto período de separação. Sabe-se que esse protocolo produz nos filhotes alterações comportamentais, metabólicas, neuroendócrinas e neuroquímicas persistentes. Na vida adulta, animais submetidos à manipulação no período neonatal demonstram menor medo, maior atividade e exploração quando expostos a um ambiente novo (LEVINE *et al.*, 1967) e a uma situação de perigo potencial, como quando exploram um ambiente desconhecido na presença

de um predador (PADOIN *et al.*, 2001). Esses animais também exibem reatividade diminuída ao estresse agudo e crônico (LEVINE *et al.*, 1967; ADER, GROTA, 1969; PADOIN *et al.*, 2001; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004), maior concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo, que está relacionada com a exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides (GCs) (ADER, GROTA, 1969; MEANEY *et al.*, 1989).

Estudos recentes têm demonstrado que a manipulação neonatal determina alterações persistentes no comportamento alimentar de ratos adultos. Animais manipulados consomem mais alimentos palatáveis (SILVEIRA *et al.*, 2004; DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007) em comparação com animais não-manipulados nos primeiros dias de vida. Mais recentemente, foi descrito que a manipulação neonatal reduz o metabolismo dopaminérgico e a taxa de renovação (*turnover*) da serotonina no núcleo acumbens de animais adultos (SILVEIRA *et al.*, 2010; PORTELLA *et al.*, 2010). Níveis diminuídos de grelina no plasma (SILVEIRA *et al.*, 2006), redução nos receptores de dopamina D3 no núcleo accumbens (BRAKE *et al.*, 2004), assim como aumento nos níveis de opióides em diferentes regiões cerebrais (PLOJ *et al.*, 2006) foram identificados em animais manipulados. Adicionalmente, a manipulação neonatal altera a resposta metabólica dos animais, onde se observa uma maior eficiência calórica (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007) e uma proteção contra o acúmulo de gordura abdominal, após exposição crônica a uma dieta altamente palatável nesses animais (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007). Atividade simpática diminuída (YOUNG; 2000) também foi observada em animais manipulados no período neonatal.

2.2 CUIDADO MATERNO

A relação materno-infantil desempenha um papel determinante em diversos aspectos relacionados à saúde mental (NIEMI *et al.*, 2004^{a,b}), comportamento, incluindo comportamento alimentar (WRIGHT *et al.*, 2006^a; BURDETTE *et al.*, 2006) e metabolismo (FAITH *et al.*, 2003; BURDETTE *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2006^b). Em mamíferos, a mãe representa o principal estímulo ambiental, assim como o mais importante provedor para o seu descendente, de forma que determinadas variáveis associadas com a mãe correlacionam-se com desfechos observados na criança mais tarde na vida (SAVINO *et al.*, 2006). Além disso, o cuidado materno exerce um efeito profundo, persistente, o qual pode, ainda, estender-se entre gerações em animais (CHAMPAGNE *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2006) e em humanos (PRUESSNER *et al.*, 2004).

Modelos experimentais abordando variações naturais do cuidado materno demonstram que filhotes de mães altamente cuidadoras, apresentam reduzida resposta ao estresse quando adultos em comparação com filhotes de mães pouco cuidadoras, em razão da expressão aumentada de RNA mensageiro para receptores de GCs no hipocampo (LIU *et al.*, 1997; CHAMPAGNE *et al.*, 2008), com quantidade aumentada destes receptores nesta área e, portanto, maior a retroalimentação negativa em relação aos filhotes de mães pouco cuidadoras. Adicionalmente, esses animais apresentam menor medo, maior exploração quando expostos a um ambiente novo e menor latência para consumir um novo alimento (CALDJI *et al.*, 1998). Dessa forma, o cuidado materno durante a infância parece ter um papel fundamental na programação das respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse na vida adulta (LIU *et al.*, 1997; CIRULLI *et al.*, 2003; CAMERON *et al.*, 2005).

Dentro desse contexto das variações naturais no cuidado da mãe para com os seus filhotes, Meaney e colaboradores, desde a década de 90, têm se dedicado a investigar o mecanismo pelo qual o cuidado materno induz essas alterações persistentes. Esses pesquisadores propuseram que os eventos pós-natais, como a manipulação e o aumento do cuidado materno, atuam através de vias serotoninérgicas (SMYTHE *et al.*, 1994) que induzem a expressão de receptores glicocorticóides no hipocampo (MITCHELL *et al.*, 1990; YAU *et al.*, 1997; MEANEY *et al.*, 2000; CARVIN *et al.*, 2003).

De maneira semelhante aos animais manipulados, filhotes de mães altamente cuidadoras, quando adultos, além da clássica alteração persistente da atividade do eixo HPA (LIU *et al.*, 1997), também apresentam alterações no comportamento alimentar e em hormônios relacionados com a regulação do apetite. Filhotes de mães altamente cuidadoras consomem mais alimento palatável e têm menores níveis de grelina no plasma em comparação com filhotes de mães pouco cuidadoras, quando adultos (Tese de Doutorado de Patrícia Pelufo Silveira, 2007). A concordância desses achados em um modelo de variação natural do cuidado materno com estudos prévios utilizando um modelo de manipulação nos primeiros dias de vida (SILVEIRA *et al.*, 2004, 2006), sugere o cuidado materno como um mediador dos efeitos provocados pelo ambiente precoce.

Assim, considerando a importância do cuidado materno no início da vida e suas implicações subsequentes, e fazendo uma analogia com a prática clínica, tem se observado um crescente incentivo à prática do contato precoce materno-infantil nas maternidades, através da criação de Programas de Saúde Pública direcionados para os benefícios gerados por essa interação na saúde de ambos mãe e filho. Algumas evidências dos efeitos do contato materno-infantil têm sido demonstradas, especialmente sobre a modulação do sistema motor (FERBER, MAKHOUL, 2004), desenvolvimento cognitivo e neurológico do recém-nascido

(FELDMAN, EIDELMAN, 2003; CHARPAK *et al.*, 2005), além de prepará-lo para o enfrentamento do ambiente extra-uterino e seus estímulos.

2.3 EVENTOS PRECOSES E ALTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Relatos da literatura demonstram que o ambiente precoce determina alterações no comportamento alimentar, possivelmente através da programação de hormônios envolvidos na regulação do apetite. Mais especificamente, uma baixa disponibilidade de nutrientes durante períodos de intenso crescimento e desenvolvimento, como durante a gestação por exemplo, induz um consumo aumentado de alimentos ricos em gordura (BELLINGER *et al.*, 2004), níveis diminuídos de leptina e aumentados de grelina no plasma da prole adulta (DESAI *et al.*, 2005). Adicionalmente, a desnutrição intra-uterina acompanhada de um ambiente com elevada oferta de nutrientes, ou seja, seguida por um crescimento acelerado pós-natal determina níveis elevados de leptina na prole (DESAI *et al.*, 2005). Recentemente, esse mesmo grupo de pesquisadores descreveu uma hiperfagia programada em animais com restrição de crescimento intra-uterino e propuseram que uma função anorexigênica reduzida, identificada nesses animais, poderia estar contribuindo para tal alteração comportamental (DESAI *et al.*, 2007). De forma semelhante, utilizando um modelo de desnutrição materna durante o período perinatal, outros investigadores descreveram alterações na regulação do apetite, identificando uma redução expressiva dos níveis plasmáticos de leptina e uma diminuída expressão gênica dos neurônios anorexigênicos POMC (propiomelanocortina) no hipotálamo da prole (DELAHAYE *et al.*, 2008). Estudos utilizando modelos experimentais de obesidade materna relatam desfechos muito semelhantes aos observados na prole de ratas

desnutridas durante o período perinatal. Há evidências de hiperfagia (WALKER *et al.*, 2008; NIVOIT *et al.*, 2009), expressão reduzida de reguladores do apetite no hipotálamo, como o neuropeptídeo Y (CHEN *et al.*, 2008) e modesta preferência por alimentos gordurosos (WALKER *et al.*, 2008) na prole de mãe obesas.

Estudos experimentais, utilizando o paradigma da separação materna (filhotes retirados do ninho por mais de 30 min/dia, durante os primeiros dias de vida), observaram que o ambiente pós-natal precoce tem efeitos persistentes sobre o comportamento alimentar. Michaels e Holtzman (2006) relataram maior consumo de solução doce em animais adultos separados de suas mães durante as duas primeiras semanas de vida, quando comparados com animais controle. Outras investigações demonstraram que a separação materna durante o período neonatal induz hiperfagia de rebote em ratas fêmeas adultas (IWASAKI *et al.*, 2000).

Até o presente momento, estudos em humanos avaliando os efeitos do ambiente precoce sobre o consumo de alimentos ainda são pouco explorados. Um estudo recente investigou o impacto da restrição de crescimento intra-uterino sobre o comportamento alimentar na vida adulta; os autores observaram um maior consumo de carboidratos em mulheres restritas durante a vida fetal (BARBIERI *et al.*, 2008). Tal achado nos indica que a translação dos efeitos em animais para humanos é possível e salienta a relevância de investigações futuras para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta relação entre ambiente precoce e modificações persistentes no comportamento alimentar.

Classicamente descrito na literatura, o modelo de manipulação neonatal utilizado no presente trabalho é adequado para avaliar os efeitos do ambiente pós-natal precoce sobre o comportamento alimentar na idade adulta. Estudos anteriores provenientes de nosso laboratório descreveram que ratos manipulados nos primeiros 10 dias de vida consomem mais alimentos palatáveis, doce e salgado, quando adultos em comparação com animais não

manipulados (SILVEIRA *et al.*, 2004) e, ainda, que tal alteração no consumo não está relacionada com estado de ansiedade nesses animais (SILVEIRA *et al.*, 2006). É interessante observar que esses efeitos são observados quando animais manipulados são expostos agudamente a esse tipo de alimento, porém, durante um período de exposição crônica ao alimento palatável, o consumo passa a não diferir entre animais manipulados e intactos (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007). No entanto, observa-se que, quando animais manipulados são expostos novamente e de forma aguda ao alimento palatável após um período curto de privação desse tipo de alimento, esses animais restabelecem seu consumo aumentado de doce em comparação com seus controles (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2010). As alterações inatas no comportamento alimentar dos animais manipulados durante o período neonatal muito se assemelham aos achados em animais adultos descendentes de mães altamente cuidadoras, onde se demonstra um maior consumo de alimento palatável na caixa-moradia (Tese de Doutorado de Patrícia Pelufo Silveira, 2007).

2.4 EFEITOS DO CONSUMO DE ALIMENTOS PALATÁVEIS – UMA ABORDAGEM NEUROQUÍMICA

Evidências da literatura descrevem que o consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura provoca modificações neuroquímicas em sistemas neurotransmissores como o mesolímbico, envolvido no comportamento alimentar e na recompensa (LEVINE *et al.*, 2003). Por exemplo, o consumo de alimento palatável induz a ativação do sistema de recompensa (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005), e se observa que ratos expostos ao alimento doce exibem uma maior resposta dopaminérgica, medida pela liberação aumentada

de dopamina no núcleo acumbens e no córtex pré-frontal medial (GAMBARANA *et al.*, 2003). Outras abordagens experimentais demonstram que o consumo intermitente de sacarose aumenta repetidamente a liberação de dopamina no núcleo acumbens, e esse aumento já pode ser observado durante a primeira hora de acesso ao alimento doce (RADA *et al.*, 2005). Dados recentes mostram que a exposição crônica a dietas ricas em gordura altera a expressão gênica de receptores de dopamina D2 no estriado e D4 no núcleo ventromedial do hipotálamo, assim como aumenta a expressão de tirosina hidroxilase (essencial para a produção de dopamina) na área tegmental ventral (HUANG *et al.*, 2005, LI *et al.*, 2009). Outras abordagens experimentais demonstram o efeito da exposição precoce à dieta rica em gordura alterando os marcadores da sinalização de dopamina no núcleo acumbens em ratos adultos (TEEGARDEN *et al.*, 2009). Além disso, uma experiência precoce, como por exemplo a interação mãe-filhote, determina uma redução do metabolismo dopaminérgico no núcleo acumbens na vida adulta (SILVEIRA *et al.*, 2010).

De forma muito semelhante à dopamina, os opióides estão ligados com o sistema de recompensa. Sua sinalização ocorre no núcleo acumbens e esses peptídeos desempenham um papel importante no mecanismo de regulação do apetite. O envolvimento dos opióides no consumo de alimentos palatáveis foi inicialmente descrito por Yim e Lowy, em 1984, estudo este que gerou um crescente interesse em investigar a influência de tais neuroreguladores sobre o comportamento alimentar. Um estudo recente demonstrou que o consumo de uma dieta rica em açúcar está associado com a atividade de alguns neuroreguladores, incluindo os opióides (OLSZEWSKI *et al.*, 2009). Outros investigadores confirmam esse envolvimento dos opióides no consumo de alimentos palatáveis (BARBANO *et al.*, 2009, NATHAN, BULLMORE, 2009) e acrescentam que seus receptores estão envolvidos em alguns tipos de transtornos do comportamento alimentar, como por exemplo na síndrome do comer compulsivo em animais bem como em humanos (NATHAN, BULLMORE, 2009). Vale

ressaltar que a influência dos opióides no comportamento alimentar já havia sido anteriormente descrita por Drewnowski e colaboradores (1992) em um estudo envolvendo mulheres que apresentavam o comportamento do comer compulsivo.

O conhecimento e a descrição dos peptídeos cerebrais como neurotransmissores abriram caminhos para o surgimento de investigações sobre os efeitos do consumo de alimentos e do uso de drogas sobre o sistema dopaminérgico (HOEBEL, 1985). Desde então, a literatura tem dado ênfase para as similaridades dos efeitos produzidos pelos alimentos palatáveis e pelas drogas de abuso. Mais especificamente, relata-se que o consumo de alimentos palatáveis estimula sistemas neuronais envolvidos na dependência de drogas. Alguns autores, por exemplo, descrevem que o consumo de alimentos palatáveis, assim como o uso de drogas de adição, estimula a liberação de dopamina e opióides no núcleo acumbens (HERNANDEZ, HOEBEL, 1988; SALAMONE *et al.*, 1994) através da ativação dos receptores de opióides na área tegmental ventral (TANDA, DI CHIARA, 1998). Além dos efeitos neuroquímicos, outra semelhança relevante com as drogas de adição é que os alimentos palatáveis também são descritos por causarem dependência, especialmente quando consumidos em excesso (COLANTUONI *et al.*, 2002). Sugere-se que o alimento doce possui uma capacidade potencial de causar dependência por estimular a liberação de dopamina e opióides no núcleo acumbens (AVENA *et al.*, 2008). Utilizando um modelo animal esse grupo de pesquisadores avaliou alguns componentes comportamentais de adição que se relacionam com modificações neuroquímicas, as quais também são observadas com o uso de drogas. Tais investigadores observaram alterações no ligante do receptor de dopamina e opióide, além de liberação de dopamina no núcleo acumbens (AVENA *et al.*, 2008).

Outro aspecto a ser abordado aqui é a influência do tipo de alimento palatável na resposta ao estresse, modificando a atividade do eixo HPA. Em humanos, por exemplo, uma sobrecarga de carboidratos, após uma noite de jejum, induz um aumento na secreção de

cortisol induzida por estresse (GONZALEZ-BONO *et al.*, 2002). Por outro lado, o consumo crônico de uma dieta rica em carboidratos provoca uma diminuição nos níveis basais de cortisol em relação a indivíduos recebendo uma dieta rica em proteínas (ANDERSON *et al.*, 1987). Em animais, o consumo de alimentos altamente calóricos, ricos em açúcar e gordura (*comfort foods*), provoca uma redução na resposta do eixo HPA ao estresse (PECORARO *et al.*, 2004), sugerindo um efeito metabólico-periférico da dieta sobre o cérebro (DALLMAN *et al.*, 2003). Diferentemente, dietas ricas em gordura realçam a secreção de glicocorticóides basal e induzida por estresse, possivelmente agindo como um fator estressor (TANNENBAUM *et al.*, 1997; KAMARA *et al.*, 1998). Sugere-se que os glicocorticóides, assim como a insulina, agem estimulando a ingestão de alimentos com elevado valor energético (*comfort foods*), e esses, por sua vez, alteram os estoques de gordura abdominal (PECORARO *et al.*, 2005; DALLMAN *et al.*, 2005) e também parecem proteger o eixo HPA das alterações associadas ao estresse (DALLMAN *et al.*, 2003, 2005).

2.5 ATIVIDADE DAS COLINESTERASES E RESPOSTA METABÓLICA

As colinesterases (ChEs) são enzimas que catalisam a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina, além de hidrolisarem outros ésteres de colina (MACK, ROBITZKI, 2000), e essa reação é fundamental para que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após a ativação no cérebro assim como na periferia. Duas classes de ChEs estão presentes nos vertebrados: acetilcolinesterase (AChE; E.C 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE; E.C 3.1.1.8). A AChE é encontrada principalmente nas hemácias, sinapses nervosas e no músculo estriado. A BuChE está presente em diversos

tecidos, incluindo fígado, coração, plasma, pâncreas, endotélio vascular e sistema nervoso (MACK, ROBITZKI, 2000). Existe um crescente interesse da comunidade científica em investigar as ChEs, e isso se deve, especialmente, à sua relação com a resposta ao estresse (MESHORER, SOREQ, 2006), bem como à sua associação direta com fatores de risco para doença cardiovascular (ALCANTARA *et al.*, 2002; CALDERON-MARGALIT *et al.*, 2006; VALLE *et al.*, 2006).

Evidências apontam para uma associação entre a atividade da ChE no plasma e parâmetros aumentados de adiposidade, perfil lipídico, bem como resistência à insulina e ocorrência aumentada de síndrome metabólica (RUSTEMEIJER *et al.*, 2001; ALCANTARA *et al.*, 2002; KÁLMÁN *et al.*, 2004; MUACEVIĆ-KATANECA *et al.*, 2005; LUCIĆ VRDOLJAK *et al.*, 2005; RANDELL *et al.*, 2005; CALDERON-MARGALIT *et al.*, 2006; VALLE *et al.*, 2006; IWASAKI *et al.*, 2007). Outros autores sugerem que a atividade aumentada da ChE no plasma pode ser o primeiro sinal de níveis elevados de triglicerídios plasmáticos e também de metabolismo alterado de lipoproteínas (BRADAMANTE *et al.*, 2006). Adicionalmente, tanto a exposição ao estresse quanto a glicocorticóides determinam alterações na atividade das ChEs. Estudos relatam atividade diminuída da enzima ChE no soro após exposição a glicocorticóides ou ao estresse, porém com um efeito mais discreto sobre a atividade da ChE cerebral (VERJEE *et al.*, 1977; WEBER *et al.*, 1999; SERVATIUS *et al.*, 2000).

Considerando que a atividade das ChEs é influenciada pela exposição a glicocorticóides e que seus níveis elevados estão relacionados com alterações endócrino-metabólicas, dessa forma, animais manipulados no período neonatal poderiam apresentar um padrão diferente de variação na atividade dessa enzima em resposta a um dieta altamente palatável, visto que esses animais têm uma reduzida reatividade ao estresse, sendo expostos a

níveis mais baixos de GCs; como consequência, animais manipulados demonstrariam uma reduzida predisposição a doenças metabólicas.

2.6 Na^+, K^+ -ATPASE E PERFIL METABÓLICO

A Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima essencial, responsável pelo transporte ativo de íons sódio e potássio, necessário para gerar e manter o potencial de membrana para a excitabilidade neural. Esta enzima está presente em altas concentrações no cérebro, consumindo de 40 a 50% do ATP gerado neste tecido (ERECÍŃSKA, SILVER, 1994).

Estudos recentes têm demonstrado que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está relacionada com alterações no metabolismo, podendo variar em função de doenças endócrino-metabólicas. Por exemplo, obesidade, diabetes tipo II, lipídios plasmáticos elevados e pressão arterial aumentada têm sido associados com uma diminuição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase (IANNELLO^a *et al.*, 2007; IWALOKUN *et al.*, 2007; TEMEL, AKYUZ 2007; IANNELLO^b *et al.*, 2007; RODRIGO *et al.*, 2007). Atividade reduzida da Na^+, K^+ -ATPase foi observada em animais (AYDEMIR-KOKSOY, TURAN, 2008) assim como em pacientes diabéticos (IWALOKUN *et al.*, 2007). A atividade da enzima também se mostrou diminuída em ratos após a administração de leptina intra-peritoneal (BELTOWSKI *et al.*, 2002, 2004), entretanto, na maioria desses estudos a atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi determinada em diversos tecidos, como rim, aorta, eritrócito e tecido adiposo, diferente do presente trabalho que avaliou a atividade da enzima em regiões cerebrais como hipocampo e amígdala.

Centralmente, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está relacionada com transtornos psiquiátricos; evidências têm demonstrado uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase em

algumas doenças psiquiátricas, como por exemplo, esquizofrenia e depressão (RYBAKOWSKI *et al.*, 1994; GAMARO *et al.*, 2003; DE VASCONCELLOS *et al.*, 2005). É interessante ressaltar que estudos *in vitro* demonstram que o cacau, principal componente do chocolate, atua como um potente inibidor da atividade da Na^+, K^+ -ATPase (HARLAN, MANN, 1982), entretanto, até o presente momento, muito pouco se conhece sobre os seus efeitos *in vivo*.

Dessa forma, o presente trabalho se propôs avaliar e aumentar o conhecimento sobre os efeitos do chocolate sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no cérebro de ratas, manipuladas e não manipuladas no período neonatal, cronicamente expostas a esse tipo de alimento na vida adulta. Adicionalmente, partindo do pressuposto que animais manipulados são menos reativos a situações de estresse, e são protegidos contra o acúmulo de gordura abdominal após exposição crônica a dieta palatável, poderiam esses animais apresentar um padrão diferente de atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

2.7 PROTEINA S100B E RESPOSTA METABÓLICA

A S100B é uma proteína ligadora de cálcio, a qual é expressa predominantemente pelos astrócitos no cérebro de vertebrados (MARENHOLZ *et al.*, 2004). Embora tenha sido, durante muito tempo, considerada uma proteína de origem cerebral, mais recentemente algumas evidências têm sugerido sua produção em outros tecidos, como nos adipócitos (STEINER *et al.*, 2007). A expressão da S100B e/ou sua secreção é modulada por vários fatores, incluindo ACTH (SUZUKI *et al.*, 1987), o qual é conhecido como um mediador da resposta ao estresse. Níveis aumentados de S100B foram observados em animais

(SCACCIANOCE *et al.*; 2004; MARGIS *et al.*, 2004; BARROS *et al.*, 2006; DIEHL *et al.*, 2007) e humanos (SCHULPIS *et al.*, 2006; TSKITISHVILI *et al.*, 2006) após exposição ao estresse; em diversos tecidos como plasma, cérebro e liquor. Estudo realizado *in vitro* demonstra liberação aumentada de S100B durante estresse metabólico (GERLACH *et al.*, 2006).

De forma crescente, diversas evidências têm destacado o papel da proteína S100B como um potencial marcador bioquímico de dano cerebral (KLEINDIENST *et al.*, 2007; HERGENROEDER *et al.*, 2008; LIAO *et al.*, 2008; KOCHANNEK *et al.*, 2008; RAINEY *et al.*, 2009). Níveis aumentados de S100B no plasma estão associados com lesão do SNC (SAVOLA *et al.*, 2004; BERGER *et al.*, 2005; GU *et al.*, 2007; ANDREAZZA *et al.*, 2007). Além disso, síntese elevada de S100B foi relatada após lesões metabólico-cerebrais (BAYDAS *et al.*, 2003, 2005).

Estudos têm demonstrado que a dieta e o estado nutricional são fatores importantes que influenciam os níveis de S100B. Níveis alterados de S100B no plasma têm sido descritos em animais submetidos a um tipo de dieta, composta predominantemente por proteína e gordura (ZIEGLER *et al.*; 2004). Adicionalmente, a condição nutricional também constitui um fator importante e algumas abordagens têm demonstrado níveis diminuídos de S100B em condições de jejum crônico e a normalização desses níveis ocorre com o ganho de peso (HOLTKAMP *et al.*, 2008). Entretanto, até o presente momento, muito pouco se conhece a respeito dos efeitos da dieta, bem como de uma intervenção precoce, sobre os níveis de S100B plasmáticos; dessa forma, este trabalho se propõe avaliar os efeitos do ambiente pós-natal, assim como da dieta palatável e hipercalórica e da sua retirada, sobre os níveis de S100B no plasma de ratas fêmeas submetidas ou não a manipulação no período neonatal.

3 JUSTIFICATIVA

Eventos precoces ocorridos na fase inicial de desenvolvimento e crescimento somático podem influenciar o padrão de saúde e doença na idade adulta. Há fortes evidências associando a ocorrência de experiências estressantes precoces com alterações neuroendócrinas e comportamentais que levam a um desempenho metabólico precário em indivíduos adultos. Neste caso temos como exemplo, a associação da restrição de crescimento intra-uterino com obesidade bem como outras alterações endócrino-metabólicas no adulto. Contudo, na literatura, ainda são restritas as evidências sobre intervenções precoces que confirmam proteção contra desfechos metabólicos inadequados. Portanto, este estudo se propõe a explorar esta lacuna avaliando a influência de uma intervenção precoce para alterações metabólicas, assim como os possíveis mecanismos envolvidos nessa proteção, em animais submetidos a um evento nutricional de risco.

4 OBJETIVOS

GERAL

Estudar os efeitos da manipulação neonatal sobre a preferência alimentar e a regulação metabólica de ratas adultas, avaliando parâmetros metabólicos e neuroquímicos em resposta à exposição crônica a uma dieta hipercalórica e palatável (chocolate), assim como a um período de abstinência.

ESPECÍFICOS

Seção I – Estudo dos efeitos da manipulação neonatal sobre o comportamento alimentar, o metabolismo dos lipídios assim como sobre a atividade de colinesterases específicas de ratas adultas expostas cronicamente à dieta palatável e privadas desse tipo dieta.

- Identificar os efeitos da manipulação neonatal e da exposição crônica à dieta palatável, assim como da sua privação, sobre o consumo de alimento palatável, o peso corporal, o acúmulo de gordura abdominal e sobre os níveis basais de triglicerídios no plasma. Avaliar a atividade das colinesterases no córtex cerebral bem como no soro.

Seção II – Estudo dos efeitos da manipulação neonatal sobre a resposta metabólica e neuroquímica, bem como sobre o comportamento de ratas adultas expostas cronicamente à dieta palatável e privadas desse tipo dieta.

- Verificar os efeitos da manipulação neonatal e da exposição crônica à dieta palatável, assim como da sua privação, sobre os níveis basais de proteína S100B no plasma, sobre a concentração de S100B na gordura abdominal e sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em diferentes estruturas cerebrais como hipocampo e amígdala. Avaliar o comportamento, através da tarefa de campo aberto, após curto período de privação da dieta palatável.

Seção III – Experimentos adicionais desenvolvidos durante o Estágio de Doutorado no Exterior (PDEE), avaliando os efeitos das variações naturais do cuidado materno sobre o consumo de alimento palatável e os parâmetros metabólicos de animais adultos cronicamente expostos a uma dieta rica em gordura.

5 HIPÓTESES DE TRABALHO

Considerando que animais manipulados no período neonatal são classicamente descritos por apresentarem, na vida adulta, uma diferenciada atividade do eixo HPA, determinada pelo aumento da retroalimentação negativa dos glicocorticóides e pela resposta reduzida ao estresse, além de demonstrarem um cuidado maternal aumentado e um menor depósito de gordura abdominal após exposição crônica a dieta palatável; dessa forma, nossas hipóteses de estudo eram de que estes animais apresentariam: (1) alteração no metabolismo da gordura corporal; (2) alteração na atividade de colinesterases específicas relacionadas com a resposta endócrino-metabólica; (3) alterações nos níveis e na concentração de S100B relacionada com mediadores de resposta ao estresse; (4) alterações na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase relacionada com a resposta endócrino-metabólica; (5) alterações desses parâmetros e de desfechos comportamentais em resposta à privação da dieta palatável e (6) o cuidado materno como mediador destes efeitos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratas Wistar prenhes provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil), foram randomicamente selecionadas. As ratas permaneceram, individualmente, em caixas-moradia, confeccionadas em *Plexiglas* medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de maravalha, e foram mantidas em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, limpeza das caixas uma vez por semana, água e ração padrão *ad libitum*. Todas as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes nas primeiras 24h após o nascimento e mantidas intactas, exceto para os procedimentos de manipulação que foram realizados entre às 09:00 e 11:00h.

Mais de uma ninhada foi submetida ao procedimento de manipulação no mesmo dia; assim, neste período de 2 horas de procedimento estava incluído o tempo para: instalar a incubadora, trazer as caixas-moradia do biotério para a sala de experimentos, habituar brevemente as genitoras à nova sala, remover cuidadosamente os filhotes da ninhada, fazer a manipulação em si, e em seguida, retornar os filhotes para a mãe e, novamente após um breve período, retornar a caixa-moradia para o biotério. O pesquisador tinha o cuidado de trocar as luvas entre a manipulação de cada ninhada, para evitar a dispersão de qualquer tipo de odor de uma ninhada para outra.

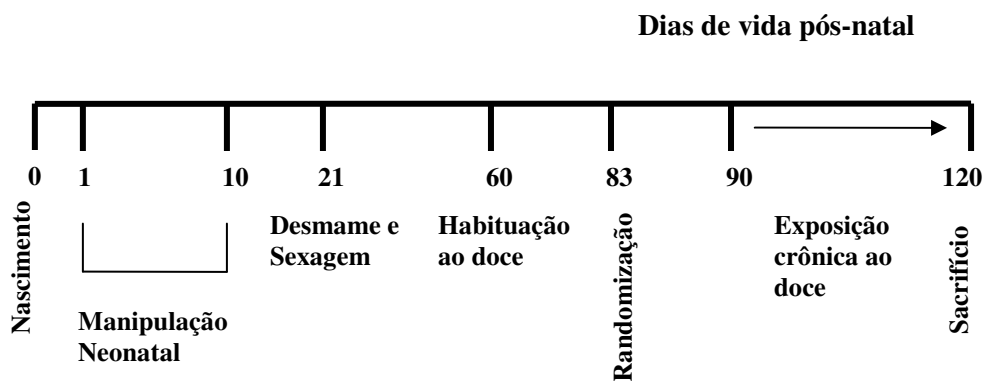
O dia do nascimento foi considerado o dia 0 (zero). As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no dia 21 pós-natal. Somente ratas fêmeas foram alocadas para o presente

trabalho, os machos foram utilizados em outros experimentos. Foram utilizadas duas fêmeas da mesma ninhada para o mesmo grupo, considerando os 4 grupos (ver abaixo). Após o desmame, as ratas fêmeas foram mantidas em torno de quatro a cinco por caixa, em ambiente controlado e sem qualquer tipo de manipulação até o início da exposição ao alimento palatável (dia 60).

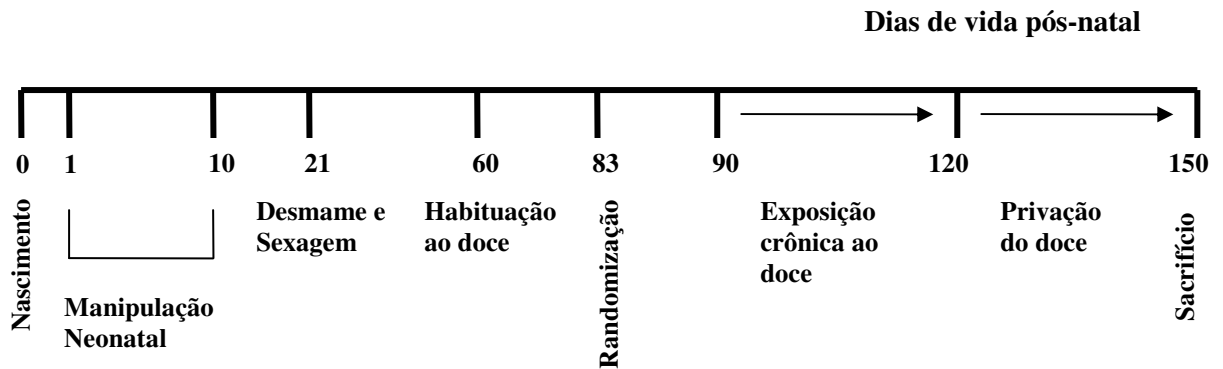
Um total de 48 ratas fêmeas foi utilizado em diferentes experimentos, sendo essas derivadas de 15 ninhadas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

As linhas de tempo esquematizadas abaixo demonstram a sequência em que os procedimentos experimentais foram realizados, nos diferentes momentos da vida das ratas:

Experimento 1:



Experimento 2:



6.2 MANIPULAÇÃO NEONATAL

Grupo não-manipulado: Filhotes permaneceram com a mãe, sem manipulação neonatal, até o desmame. A limpeza rotineira das caixas foi interrompida durante esse período.

Grupo manipulado: Este procedimento foi realizado conforme anteriormente descrito (SILVEIRA *et al.*, 2004; DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007). A mãe foi gentilmente afastada para um lado da caixa-moradia e os filhotes foram removidos do ninho e colocados dentro de uma caixa limpa forrada com papel toalha. Então, a ninhada foi colocada em uma incubadora ajustada para manter uma temperatura ambiente de 30-32°C (temperatura da água de 34° C), enquanto a mãe foi mantida na caixa-moradia posicionada ao lado da incubadora. Após 10 minutos, os filhotes (machos e fêmeas) retornaram para sua respectiva mãe. Este procedimento foi realizado do dia 1 ao dia 10 pós-natal, em seguida, os filhotes foram mantidos com a mãe, sem manipulação, até o dia 21 pós-natal.

6.3 HABITUAÇÃO AO ALIMENTO NOVO

A partir do dia 60 de vida, as ratas foram habituadas a um novo ambiente contendo um alimento novo. Neste experimento, as fêmeas foram colocadas em uma caixa retangular medindo 40 x 15 x 20 cm, com partes inferior e laterais revestidas em madeira e parte superior em vidro transparente. Uma porção de chocolate pesada previamente (chocolate ao leite – Neugebauer®) foi colocada em uma das extremidades da caixa-corredor. As ratas foram habituadas a esse ambiente por 5 dias, durante 3 minutos cada dia, sob restrição alimentar (recebendo em torno de 80% do consumo habitual). No 6º dia, as ratas foram testadas para o consumo de alimento palatável, após terem recebido ração padrão *ad libitum* nas 24 horas prévias. Esses procedimentos foram realizados para verificar se as ratas fêmeas comeriam o chocolate da mesma forma que elas comumente ingerem (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007), assim como outros tipos de alimentos palatáveis (SILVEIRA *et al.*, 2004), com e sem restrição alimentar. Após esse período de habituação, as ratas receberam ração padrão *ad libitum*. Todos os procedimentos seguintes foram realizados com as fêmeas em estado alimentado.

6.4 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ALIMENTO PALATÁVEL NA CAIXA-MORADIA

No 83º dia de vida, todas as ratas foram pesadas e randomizadas em diferentes grupos, sendo colocadas em números de 3 a 4 por caixa. Os grupos foram subdivididos em 1) Não-manipulada + ração padrão, 2) Não-manipulada + chocolate + ração padrão, 3) Manipulada +

ração padrão e 4) Manipulada + chocolate + ração padrão. Uma semana depois, grupos específicos começaram a receber chocolate *ad libitum* na caixa-moradia. Durante 30 dias, porções previamente pesadas de chocolate e de ração padrão foram oferecidas, e a quantidade restante foi medida diariamente para avaliar o consumo. O consumo de alimentos foi medido por caixa e então dividido pelo número de ratas em cada caixa para determinar o consumo médio por rata. O peso corporal foi aferido uma vez por semana ao longo do período de exposição à dieta. Passados 30 dias de exposição à dieta palatável, um subgrupo de fêmeas foi sacrificado por decapitação após 6 horas de jejum.

6.5 PRIVAÇÃO DO ALIMENTO PALATÁVEL

Após a exposição crônica ao alimento palatável, um outro subgrupo de ratas fêmeas foi privado de chocolate durante um período de 30 dias, recebendo somente ração padrão e água *ad libitum*. Após as primeiras 24h de privação de chocolate, as ratas foram submetidas à tarefa de Campo Aberto, sendo avaliadas quanto à presença de sinais comportamentais espontâneos de abstinência em resposta a retirada do alimento palatável. As ratas fêmeas foram colocadas individualmente dentro de um aparato de madeira com frente de vidro transparente medindo 50 cm x 40 cm x 60 cm. O piso foi dividido igualmente em 12 retângulos de mesmo tamanho medindo 13,3 cm x 15,0 cm cada. As fêmeas foram observadas diretamente e continuamente durante 20 minutos por observadores cegos para a condição experimental. Nessa tarefa, cada rata foi testada uma única vez. Os seguintes sinais de abstinência do alimento palatável foram avaliados: número de cruzamentos entre os retângulos, permanência nos retângulos centrais, permanência em posição estendida nas patas

traseiras, movimentos de limpeza de patas e corpo, tremores de dentes e patas, tremores de cabeça e corpo, bem como número de bolos fecais.

Passados 7 dias de privação de chocolate, ratas fêmeas foram testadas quanto ao consumo desse alimento em um curto período de tempo. Para isso, as ratas foram expostas ao chocolate por 3 minutos no mesmo aparato utilizado na habituação ao alimento palatável e a quantidade consumida foi mensurada após 3 minutos, para avaliar o consumo rebote.

A avaliação do peso corporal das ratas fêmeas foi realizada após as primeiras 24h e no último dia (dia 30) de privação de chocolate.

6.6 COLETA DE SANGUE E DISSECÇÃO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS E GORDURA ABDOMINAL

As ratas fêmeas foram sacrificadas por decapitação após 6h de jejum. A ração padrão foi removida às 07:00 h (início do ciclo claro); o jejum foi realizado para minimizar a possibilidade das ratas ingerirem algum alimento perto do momento de coleta dos tecidos. O sangue foi coletado em tubos contendo anti-coagulante (heparina) para a determinação de triglicéridios (TG) e proteína S100B. O plasma foi separado e congelado a - 20°C até o dia das análises. Uma outra alíquota de sangue, em tubo isento de anti-coagulante, foi coletado, centrifugado a 1000 × g por 10 minutos e o soro foi utilizado para determinar a atividade da enzima colinesterase.

O cérebro foi removido imediatamente após decapitação. Estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e amígdala) foram dissecadas. O córtex cerebral foi dissecado, homogeneizado (1:10 v/v em 500 mM solução tampão de fosfato de potássio, pH 7.5) e centrifugado a 1000 ×

g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a análise enzimática (colinesterase). A concentração da proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

O hipocampo e a amígdala foram dissecados para preparar as membranas sinápticas para a determinação da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase. O hipocampo e a amígdala foram homogeneizados em 10 volumes (1:10, w/v) de 0,32 M de solução de sacarose contendo 5,0 mM HEPES e 0,1 mM EDTA, pH 7,4. As membranas sinápticas do hipocampo e da amígdala foram preparadas seguindo o protocolo de Jones e Matus (1974) com algumas modificações (WYSE *et al.*, 1998). O homogeneizado foi centrifugado a $1000 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi removido e centrifugado a $12,000 \times g$ durante 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em solução tampão hipotônico (5,0 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,1) a 0°C por 30 minutos, e aplicado sobre um gradiente de densidade descontínua de sacarose consistindo de camadas sucessivas de 0,3; 0,8 e 1,0 M. Após centrifugação a $69,000 \times g$ durante 120 minutos, a fração na interface entre sacarose 0,8 e 1,0 M foi assumida como a preparação da membrana da enzima.

As duas maiores porções da gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas e pesadas separadamente, utilizando uma balança com precisão de 0,0001g; foram então congeladas a -20°C para a determinação da proteína S100B.

6.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E NEUROQUÍMICAS

6.7.1 Determinação dos Níveis Plasmáticos de TGs, Níveis de Proteína S100B no Plasma e na Gordura Abdominal

Os níveis de triglicerídios no plasma foram medidos através de método enzimático utilizando um kit comercial (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). A reação colorimétrica com Quinoneimina foi mensurada a 500 nm em espectrofotômetro. A concentração de TGs no plasma foi expressa em mg/dL.

A concentração da proteína S100B foi determinada pelo método de ELISA, conforme protocolo de Leite e colaboradores (2008). O mesmo protocolo foi utilizado para medir os níveis de S100B no plasma, assim como sua concentração na gordura abdominal. Um volume de 50 µL de amostra (diluído com tampão fosfato salina contendo 0,2% de albumina) adicionado a 50 mM de solução tampão Tris foi incubado por 2 h em uma placa de ELISA previamente coberta com anticorpo anti-S100B (SH-B1) monoclonal. As placas foram lavadas com tampão de lavagem. Anti-S100B policlonal foi adicionado e incubado por 30 minutos e então as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. O anticorpo secundário conjugado a peroxidase anti-coelho foi adicionado para mais 30 minutos de incubação (amostras de plasma) ou ambos anticorpos foram incubados juntos por 1 hora (amostras de tecido). As placas foram novamente lavadas. A reação colorimétrica com *o*-fenilenodiamina foi mensurada a 492 nm no leitor de placa de ELISA.

6.7.2 Determinação da Atividade das Colinesterases no Soro e Córtex Cerebral

A atividade das colinesterases, no soro e córtex cerebral, foi determinada pelo método de Ellman e colaboradores (1961), com modificações. As taxas de hidrólise (v) foram medidas em concentrações de acetiltiocolina (ASCh) de 0,8 mM em 1mL de soluções de ensaio com 100 mM de tampão fosfato, pH 7,5, e 1,0 mM 5,5'-Ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) a 25°C. 50 μ L de soro ou de sobrenadante de córtex cerebral foram adicionados à solução reagente e pré-incubados durante 3 minutos. A hidrólise foi monitorada através da formação do di-ânion tiolato de DTNB em 412 nm por 2-3 minutos (intervalos de 30s). Todas as amostras foram realizadas em duplicatas. A atividade da enzima foi expressa em μ mol ASCh hidrolisada por hora por miligrama de proteína.

6.7.3 Determinação da Atividade da Na^+, K^+ -ATPase no Hipocampo e Amígdala

A análise da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase nas estruturas cerebrais foi realizada conforme o que se segue. O reagente de mistura para a determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase continha 5,0 mM MgCl_2 , 80,0 mM NaCl, 20,0 mM KCl e 40,0 mM Tris-HCl, pH 7,4, em um volume final de 200 μ L. A reação foi iniciada através da adição de ATP. Amostras controles foram determinadas sob as mesmas condições com a adição de 1,0 mM de ouabaina. A atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi calculada pela diferença entre as duas determinações, conforme descrito previamente por Wyse e colaboradores (1998). O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi medido através do método de Chan e colaboradores (1986). A

atividade específica da enzima foi expressa em nmol de Pi liberado por minuto por mg de proteína. Todas as medidas foram realizadas em duplicatas.

6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA de duas vias (medidas bioquímicas, neuroquímicas e comportamentais, depósito de gordura abdominal e proteína S100), ANOVA de medidas repetidas (consumo crônico de ração e chocolate, peso corporal), seguidas pelo teste post-hoc de Duncan quando indicado, ou por teste t de *Student* (consumo agudo de alimento palatável e ganho de peso). O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

REFERÊNCIAS

Ader R, Grotta LJ. Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiol Behav.* 1969;4:303-5.

Alcantara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Scartezini M, Cerci MS, Braun-Prado K, Picheth G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002;62:399-404.

Anderson KE, Rosner W, Khan MS, New MI, Pang S, Wissel PS, et al. Diet-hormone interactions: protein-carbohydrate ratio alters reciprocally the plasma levels of testosterone and cortisol and their respective binding globulins in man. *Life Sci.* 1987;40:1761-8.

Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2007;41:523-9.

Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32:20-39.

Aydemir-Koksoy A, Turan B. Selenium inhibits proliferation signaling and restores sodium/potassium pump function of diabetic rat aorta. *Biol Trace Elem Res.* 2008;126:237-45.

Barbano MF, Le Saux M, Cador M. Involvement of dopamine and opioids in the motivation to eat: influence of palatability, homeostatic state, and behavioral paradigms. *Psychopharmacology*. 2009;203:475-87.

Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, et al. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res*. 2009;65:215-20.

Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993;341:938-41.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2:577-80.

Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC. Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *J Neurosci Res*. 2006;83:787-800.

Baydas G, Reiter RJ, Yasar A, Tuzcu M, Akdemir I, Nedzvetskii VS. Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35:797-804.

Baydas G, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Donder E. Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2005; 26:417-22.

Bellinger L, Lilley C, Langley-Evans SC. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr.* 2004;92:513-20.

Beltowski J, Jamroz-Wiśniewska A, Nazar J, Wójcicka G. Spectrophotometric assay of renal ouabain-resistant Na(+)-ATPase and its regulation by leptin and dietary-induced obesity. *Acta Biochim Pol.* 2004;51:1003-14.

Beltowski J, Wójcicka G, Górny D, Marciniak A. Human leptin administered intraperitoneally stimulates natriuresis and decreases renal medullary Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat -- impaired effect in dietary-induced obesity. *Med Sci Monit.* 2002;8:221-9.

Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet.* 1993;341:339-41. Erratum in: *Lancet* 1993;341:572.

Berger RP, Adelson PD, Pierce MC, Dulani T, Cassidy LD, Kochanek PM. Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and noninflicted traumatic brain injury in children. *J Neurosurg.* 2005;103(1 Suppl):61-8.

Bradamante V, Krnić Z, Zrinski R, Konjevoda P, Reiner Z. Changes in butyrylcholinesterase activity and serum lipids after oxprenolol and glibenclamide treatments in non-diabetic rats. *Arzneimittelforschung.* 2006;56:64-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci.* 2004;19:1863-74.

Branchi I, Santucci D, Alleva E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav Brain Res.* 2001;125:49-56.

Burdette HL, Whitaker RC, Hall WC, Daniels SR. Maternal infant-feeding style and children's adiposity at 5 years of age. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006;160:513-20.

Calderon-Margalit R, Adler B, Abramson JH, Gofin J, Kark JD. Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Clin Chem.* 2006;52:845-52.

Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:5335-40.

Cameron NM, Champagne FA, Parent C, Fish EW, Ozaki-Kuroda K, Meaney MJ. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29:843-65.

Carvin CD, Parr RD, Kladde MP. Site-selective in vivo targeting of cytosine 5 DNA methylation by zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:6493-501.

Champagne DL, Bagot RC, van Hasselt F, Ramakers G, Meaney MJ, de Kloet ER, et al. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J Neurosci*. 2008;28:6037-45.

Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12736-41.

Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*. 1986;157:375-80.

Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res*. 2003;59:161-79.

Charpak N, Ruiz JG, Zupan J, Cattaneo A, Figueroa Z, Tessier R, et al. Kangaroo Mother Care: 25 years after. *Acta Paediatr*. 2005;94:514-22.

Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*. 2008;149:5348-56.

Cirulli F, Berry A, Alleva E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27:73-82.

Colantuoni C, Rada P, McCarthy J, Patten C, Avena NM, Chadeayne A, Hoebel BG. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obes Res.* 2002;10:478-88.

Crane JM, White J, Murphy P, Burrage L, Hutchens D. The effect of gestational weight gain by body mass index on maternal and neonatal outcomes. *J Obstet Gynaecol Can.* 2009;31:28-35.

Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;86:189-99.

Da Silva Benetti C, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, Dalmaz C, Goldani MZ. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res.* 2007;62:405-11.

Dallman MF, Akana SF, Laugero KD, Gomez F, Manalo S, Bell ME, et al. A spoonful of sugar: feedback signals of energy stores and corticosterone regulate responses to chronic stress. *Physiol Behav.* 2003;79:3-12.

Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:11696-701.

Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun.* 2005;19:275-80.

Davies AA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Litchfield P. Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees. *Circulation*. 2004;110:1258-62.

De Vasconcellos AP, Zugno AI, Dos Santos AH, Nietto FB, Crema LM, Gonçalves M, et al. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. *Neurobiol Learn Mem*. 2005;84:102-10.

Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*. 2008;149:470-5.

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R91-6.

Desai M, Gayle D, Han G, Ross MG. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci*. 2007;14:329-37.

Diehl LA, Silveira PP, Leite MC, Crema LM, Portella AK, Billodre MN, et al. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Res*. 2007;1144:107-16.

Drewnowski A, Krahn DD, Demitrack MA, Nairn K, Gosnell BA. Taste responses and preferences for sweet high-fat foods: evidence for opioid involvement. *Physiol Behav.* 1992;51:371-9.

Ellman GL, Courtney KD, Andres VJR, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.

Erecińska M, Silver IA. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1994;43:37-71.

Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97:61-73.

Feldman R, Eidelman AI. Skin-to-skin contact (Kangaroo Care) accelerates autonomic and neurobehavioural maturation in preterm infants. *Dev Med Child Neurol.* 2003;45:274-81.

Ferber SG, Makhoul IR. The effect of skin-to-skin contact (kangaroo care) shortly after birth on the neurobehavioral responses of the term newborn: a randomized, controlled trial. *Pediatrics.* 2004;113:858-65.

Fish EW, Shahrokh D, Bagot R, Caldji C, Bredy T, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1036:167-80.

Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science.* 1999;286:1155-8.

Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res.* 2003;28:1339-44.

Gambarana C, Masi F, Leggio B, Grappi S, Nanni G, Scheggi S, De Montis MG, Tagliamonte A. Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. *Neuroscience.* 2003;121:179-87.

Garoflos E, Stamatakis A, Rafrogianni A, Pondiki S, Stylianopoulou F. Neonatal handling on the first postnatal day leads to increased maternal behavior and fos levels in the brain of the newborn rat. *Dev Psychobiol.* 2008;50:704-13.

Gerlach R, Demel G, König HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience.* 2006;141:1697-701.

Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science.* 2004;305:1733-36.

Gonzalez-Bono E, Rohleder N, Hellhammer DH, Salvador A, Kirschbaum C. Glucose but not protein or fat load amplifies the cortisol response to psychosocial stress. *Horm Behav.* 2002;41:328-33.

Gu XH, Zhang G, Zhang XQ, Song Y, Wang T, Li SX. Clinical values of detection of serum levels of S100B and NSE in diagnosis of brain injuries at early period after cardiopulmonary bypass. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007;87:975-7.

Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35:595-601.

Harlan DM, Mann GV. A factor in food which impairs Na⁺-K⁺-ATPase in vitro. *Am J Clin Nutr*. 1982;35:250-7.

Harlow HF, Zimmermann RR. Affectional responses in the infant monkey; orphaned baby monkeys develop a strong and persistent attachment to inanimate surrogate mothers. *Science*. 1959;130:421-32.

Hergenroeder GW, Redell JB, Moore AN, Dash PK. Biomarkers in the clinical diagnosis and management of traumatic brain injury. *Mol Diagn Ther*. 2008;12:345-58.

Hernandez L, Hoebel BG. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life Sci*. 1988;42:1705-12.

Hoebel BG. Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am J Clin Nutr*. 1985;42:1133-50.

Holtkamp K, Bühren K, Ponath G, von Eiff C, Herpertz-Dahlmann B, Hebebrand J, Rothermundt M. Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain. *J Neural Transm*. 2008;115:937-40.

Huang X-F, Yu Y, Zavitsanou K, Han M, Storlien L. Differential expression of dopamine D2 and D4 receptor and tyrosine hydroxylase mRNA in mice prone, or resistant, to chronic high-fat diet-induced obesity. *Molecular Brain Research*. 2005;135:150-61.

Iannello S, Milazzo P, Belfiore F. Animal and human tissue Na,K-ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation. *Am J Med Sci*. 2007;333:1-9 (a).

Iannello S, Milazzo P, Belfiore F. Animal and human tissue Na,K-ATPase in normal and insulin-resistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects. *Obes Rev*. 2007;8:231-51 (b).

Iwalokun BA, Iwalokun SO. Association between erythrocyte Na⁺K⁺-ATPase activity and some blood lipids in type 1 diabetic patients from Lagos, Nigeria. *BMC Endocr Disord*. 2007;7:7.

Iwasaki S, Inoue K, Kiriike N, Hikiji K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol Behav*. 2000;70:551-6.

Iwasaki T, Yoneda M, Nakajima A, Terauchi Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern Med*. 2007;46:1633-39.

Jones A, Godfrey KM, Word P, Osmond C, Goulden P, Phillips DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1868-71.

Jones DH, Matus AI. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta*. 1974;356:276-87.

Kálmán J, Juhász A, Rakonczay Z, Abrahám G, Zana M, Boda K, et al. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. *Life Sci*. 2004;75:1195-1204.

Kamara K, Eskay R, Castonguay T. High-fat diets and stress responsivity. *Physiol Behav*. 1998;64:1-6.

Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;997:150-57.

Kermack WO, McKendrick AG, McKinlay PL. Death-rates in Great Britain and Sweden. Some general regularities and their significance. *Lancet*. 1934:698-703.

Khazipov R, Luhmann HJ. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci*. 2006;29:414-18.

Kleindienst A, Hesse F, Bullock MR, Buchfelder M. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog Brain Res*. 2007;161:317-25.

Kochanek PM, Berger RP, Bayir H, Wagner AK, Jenkins LW, Clark RS. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Curr Opin Crit Care*. 2008;14:135-41.

Krolow R, Noschang CG, Arcego D, Andreazza AC, Peres W, Gonçalves CA, Dalmaz C. Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite*. 2010 [Epub ahead of print].

Laitinen J, Pietilainen K, Wadsworth M, Sovio U, Jarvelin MR. Predictors of abdominal obesity among 31-y-old men and women born in Northern Finland in 1966. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58:180-90.

Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*. 2008;169:93-9.

Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*. 2001;142:1692-702.

Levine AS, Kotz CM, Gosnell BA. Sugars and fats: the neurobiology of preference. *J Nutr*. 2003;133:831S-834S.

Levine S, Alpert M, Lewis GW. Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis. *Science*. 1957;126:1347.

Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav*. 1967;2:55-59.

Li Y, South T, Han M, Chen J, Wang R, Huang XF. High-fat diet decreases tyrosine hydroxylase mRNA expression irrespective of obesity susceptibility in mice. *Brain Research*. 2009;1268:181-89.

Liao CW, Fan CK, Kao TC, Ji DD, Su KE, Lin YH, et al. Brain injury-associated biomarkers of TGF-beta1, S100B, GFAP, NF-L, tTG, AbetaPP, and tau were concomitantly enhanced and the UPS was impaired during acute brain injury caused by *Toxocara canis* in mice. *BMC Infect Dis*. 2008;8:84.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997;277:1659-62.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: *The Childhood Environment and Adult Disease*. Bock GR, Whelan J (editores). CIBA Foundation Symposium 156. Chichester: Wiley; 1991; 38-55.

Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child*. 1994;71:288-90.

Lucić Vrdoljak A, Bradamante V, Radić B, Peraica M, Fuchs R, Reiner Z. Butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in dexamethasone treated rats. *Acta Pharm.* 2005;55:177-185.

Mack A, Robitzki A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog Neurobiol.* 2000;60:607-28.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999;113:97-106.

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322:1111-22.

Margis R, Zanatto VC, Tramontina F, Vinade E, Lhullier F, Portela LV, et al. Changes in S100B cerebrospinal fluid levels of rats subjected to predator stress. *Brain Res.* 2004;1028:213-8.

Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology.* 1989;50:597-604.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Weaver S, Yau J, Chapman K, et al. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *J Neurosci.* 2000;20:3926-35.

Meshorer E, Soreq H. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci.* 2006;29:216-24.

Metcalf NB, Monaghan P. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol Evol.* 2001;16:254-60.

Michaels CC, Holtzman SG. Neonatal stress and litter composition alter sucrose intake in both rat dam and offspring. *Physiol Behav.* 2006;89:735-41.

Mitchell JB, Rowe W, Boksa P, Meaney MJ. Serotonin regulates type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures. *J Neurosci.* 1990; 10:1745–52.

Muacević-Kataneca D, Bradamante V, Reinec Z, Sucić M, Poljicanin T, Busljeta I et al. Clinical study on the effect of simvastatin on butyrylcholinesterase activity. *Arzneimittelforschung.* 2005;55:271-75.

Nathan PJ, Bullmore ET. From taste hedonics to motivational drive: central mu-opioid receptors and binge-eating behaviour. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009;12:1-14.

Niemi LT, Suvisaari JM, Haukka JK, Lonnqvist JK. Do maternal psychotic symptoms predict offspring's psychotic disorder? Findings from the Helsinki High-Risk Study. *Psychiatry Res.* 2004;125:105-15 (b).

Niemi LT, Suvisaari JM, Haukka JK, Wrede G, Lonnqvist JK. Cumulative incidence of mental disorders among offspring of mothers with psychotic disorder. Results from the Helsinki High-Risk Study. *Br J Psychiatry.* 2004;185:11-7 (a).

Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, Reusens B. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia.* 2009;52:1133-42.

Olszewski PK, Shaw TJ, Grace MK, Höglund CE, Fredriksson R, Schiöth HB, Levine AS. Complexity of neural mechanisms underlying overconsumption of sugar in scheduled feeding: involvement of opioids, orexin, oxytocin and NPY. *Peptides.* 2009;30:226-33.

O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287:863-70.

Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci.* 2001;115:1332-40.

Panagiotaropoulos T, Papaioannou A, Pondiki S, Prokopiou A, Stylianopoulou F, Gerozissis K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology*. 2004;79:109-18.

Pecoraro N, Gomez F, Dallman MF. Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30:815-25.

Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*. 2004;145:3754-62.

Ploj K, Roman E, Nylander I. Long-term effects of short and long periods of maternal separation on brain opioid peptide levels in male Wistar rats. *Neuropeptides*. 2003;37:149-56.

Portella AK, Silveira PP, Diehl LA, Crema LM, Clemente Z, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA, Dalmaz C. Early life handling decreases serotonin turnover in the nucleus accumbens and affects feeding behavior of adult rats. *Dev Psychobiol*. 2010;52:190-6.

Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A. Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [¹¹C] raclopride. *J Neurosci*. 2004;24:2825-31.

Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol*. 2001;38:239-51.

Rada P, Avena NM, Hoebel BG. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience*. 2005;134:737-44.

Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem*. 2005;38:799-805.

Rainey T, Lesko M, Sacho R, Lecky F, Childs C. Predicting outcome after severe traumatic brain injury using the serum S100B biomarker: Results using a single (24h) time-point. *Resuscitation*. 2009; 80:341-5.

Rodrigo R, Bächler JP, Araya J, Prat H, Passalacqua W. Relationship between (Na + K)-ATPase activity, lipid peroxidation and fatty acid profile in erythrocytes of hypertensive and normotensive subjects. *Mol Cell Biochem*. 2007;303:73-81.

Rustemeijer C, Schouten JA, Voerman HJ, Beynen AC, Donker AJ, Heine RJ. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? *Clin Sci (Lond)*. 2001;101:29-35.

Rybakowski JK, Lehmann W. Decreased activity of erythrocyte membrane ATPases in depression and schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 1994;30:11-4.

Salamone JD, Cousins MS, McCullough LD, Carriero DL, Berkowitz RJ. Nucleus accumbens dopamine release increases during instrumental lever pressing for food but not free food consumption. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994;49:25-31.

Savino F, Liguori SA, Oggero R, Silvestro L, Miniero R. Maternal BMI and serum leptin concentration of infants in the first year of life. *Acta Paediatr.* 2006;95:414-8.

Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemelä O, Hillbom M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma.* 2004;56:1229-34.

Scaccianoce S, Del Bianco P, Pannitteri G, Passarelli F. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein. *Brain Res.* 2004;1004:208-11.

Schulpis KH, Margeli A, Akalestos A, Vlachos GD, Partsinevelos GA, Papastamataki M et al. Effects of mode of delivery on maternal-neonatal plasma antioxidant status and on protein S100B serum concentrations. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66:733-42.

Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1032:63-84.

Servatius RJ, Ottenweller JE, Guo W, Beldowicz D, Zhu G, Natelson BH. Effects of inescapable stress and treatment with pyridostigmine bromide on plasma butyrylcholinesterase and the acoustic startle response in rats. *Physiol Behav.* 2000;69:239-46.

Singhal A, Lucas A. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet.* 2004;363:1642-45.

Silveira PP. Estudo de aspectos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos envolvidos na regulação do consumo de alimento palatável em animais manipulados no período neonatal [Tese de Doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Silveira PP, da Silva Benetti C, Ayres C, Pederiva FQ, Portella AK, Lucion AB, Dalmaz C. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav Brain Res.* 2006;173:205-10.

Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA, Lucion AB, Dalmaz C. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci.* 2010;28:111-8.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23:93-9.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav.* 2004;80:739-45.

Smotherman WP. Mother-infant interaction and the modulation of pituitary-adrenal activity in rat pups after early stimulation. *Dev. Psychobiol.* 1983;16:169-76.

Smythe JW, Rowe WB, Meaney, MJ. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Dev Brain Res.* 1994;80:183-9.

Soto IN, Mericq GV. Fetal growth restriction and insulin resistance. New findings and review of the literature. *Rev Med Chil.* 2005;133:97-104.

Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci.* 2007;8:2.

Suzuki F, Kato K, Kato T, Ogasawara N. S-100 protein in clonal astrogloma cells is released by adrenocorticotropic hormone and corticotropin-like intermediate-lobe peptide. *J Neurochem.* 1987;49:1557-63.

Tanda G, Di Chiara G. A dopamine-mu1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. *Eur J Neurosci.* 1998;10:1179-87.

Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD, Meaney MJ. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol.* 1997;273:1168-77.

Teegarden SL, Scott AN, Bale TL. Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. *Neuroscience.* 2009;162:924-32.

Temel HE, Akyuz F. The effects of captopril and losartan on erythrocyte membrane Na⁺/K⁺-ATPase activity in experimental diabetes mellitus. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2007;22:213-7.

Tskitishvili E, Komoto Y, Temma-Asano K, Hayashi S, Kinugasa Y, Tsubouchi H, et al. S100B protein expression in the amnion and amniotic fluid in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006;12:755-61.

Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE, et al. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clin Chem.* 2006;52:1014-20.

Verjee ZH, Behal R, Ayim EM. Effect of glucocorticoids on liver and blood cholinesterases. *Clin Chim Acta.* 1977;81:41-6.

Walker CD, Naef L, d'Asti E, Long H, Xu Z, Moreau A, Azeddine B. Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1144:189-202.

Weaver IC, Szyf M, Meaney MJ. From maternal care to gene expression: DNA methylation and the maternal programming of stress responses. *Endocr Res.* 2002;28:699.

Weber U, Brank M, Grubic Z. Glucocorticoids differentially control synthesis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat liver and brain. *Chem Biol Interact.* 1999;119-120:341-47.

Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res.* 1975;9:154-56.

Wright CM, Parkinson KN, Drewett RF. How does maternal and child feeding behavior relate to weight gain and failure to thrive? Data from a prospective birth cohort. *Pediatrics*. 2006;117:1262-9 (a).

Wright CM, Parkinson KN, Drewett RF. The influence of maternal socioeconomic and emotional factors on infant weight gain and weight faltering (failure to thrive): data from a prospective birth cohort. *Arch Dis Child*. 2006;91:312-7 (b).

Wyse AT, Brusque AM, Silva CG, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CM. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport*. 1998;9:1719-21.

Yau JLW, Noble J, Seckl JR. Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neuroscience*. 1997;78:111-21.

Yim GK, Lowy MT. Opioids, feeding, and anorexias. *Fed Proc*. 1984;43:2893-7.

Young JB. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:R1745-52.

Zhang TY, Bagot R, Parent C, Nesbitt C, Bredy TW, Caldji C, et al. Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. *Biol Psychol*. 2006;73:72-89.

Ziegler DR, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, Mendez A, et al. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res.* 2004;50:375-9.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO: ARTIGOS ORIGINAIS

Esta tese deu origem a dois artigos originais que são apresentados em forma de seções (seção I e seção II).

7.1 SEÇÃO I – ARTIGO 1

Estudo dos efeitos da manipulação neonatal sobre o comportamento alimentar, o metabolismo dos lipídios assim como sobre a atividade de colinesterases específicas de ratas adultas expostas cronicamente à dieta palatável e privadas desse tipo dieta.

Artigo 1 (submetido): da Silva Benetti C; Silveira PP; Portella AK; Matté C; Stefanello FM; Wyse ATS; Dalmaz C; Goldani MZ. *Neonatal environmental intervention alters the vulnerability to the metabolic effects of chronic palatable diet exposure in adulthood.*

Title: Neonatal environmental intervention alters the vulnerability to the metabolic effects of chronic palatable diet exposure in adulthood.

Running Title: Neonatal handling and metabolism.

List of authors: Carla S. Benetti^{1,4}; Patrícia P. Silveira^{1,4}, André K. Portella^{1,4}; Cristiane Matté³; Francieli M. Stefanello³; Angela T. S. Wyse³; Carla Dalmaz^{2,3}; Marcelo Z. Goldani^{1,4}.

¹PPG Saúde da Criança e do Adolescente, FAMED, UFRGS (postal code: 90035-003), ²PPG Neurociências, ICBS, UFRGS (90046-900), ³Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS (90035-003) e ⁴Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS (90035-903). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Mailing address: Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco

90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Fone: 051- 3359-8515

Fax: 051- 3359-8001

Email: mgoldani@hcpa.ufrgs.br (Goldani, MZ).

Financial Support: CNPq, Capes and FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that early environmental interventions influence the consumption of palatable food and the abdominal fat deposition in female rats chronically exposed to a highly caloric diet in adulthood. Our goal, in this study, was to verify the metabolic effects of the chronic exposure, in adulthood, to a highly palatable diet, and the response to its withdrawal in neonatally-handled and non-handled rats. We measured the consumption of foods (standard lab chow and chocolate), body weight gain, abdominal fat deposition, plasma triglycerides, as well as serum butyrylcholinesterase and cerebral acetylcholinesterase activities during chronic chocolate exposure and thereafter in adult female rats exposed or not to neonatal handling (10 min/day, 10 first days of life). We observed that handled rats increased chocolate consumption in comparison to non-handled animals after one week of chocolate withdrawal, these animals also decreased body weight in the first 24 hours of chocolate withdrawal. Non-handled female rats chronically exposed to chocolate increased abdominal fat deposition in comparison to handled animals, and this effect remained after 30 days of chocolate withdrawal. In addition, chronic chocolate consumption increased serum butyrylcholinesterase activity in non-handled, but not in handled rats, and this effect disappeared after chocolate withdrawal. Chocolate deprivation decreased cerebral acetylcholinesterase activity in both handled and non-handled animals. These findings suggest that neonatal handling modulates the preference for palatable food and induces a specific metabolic response that may be more adaptive in comparison to non-handled rats.

Key words: neonatal environment, neonatal handling, feeding behavior, highly palatable food, abdominal fat deposition, butyrylcholinesterase activity, acetylcholinesterase activity, withdrawal.

Abbreviations: **BuChE**, butyrylcholinesterase, **AChE**, acetylcholinesterase, **ChE**, cholinesterase, **HPA**, hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

INTRODUCTION

It is well established that the early environment is associated with endocrine-metabolic alterations in rats (1, 2) and humans (3) later in life. It has also been suggested that these associations may be mediated by the programming of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis activity (4, 5), one of the main systems involved in stress responses (6).

From the several experimental approaches proposed, neonatal handling is a good research model to evaluate the effects of precocious interventions on several outcomes in adult life. This protocol is a brief, repeated and apparently innocuous separation from the mother during the neonatal period and is associated with increased maternal care as soon as the pups are returned to the home-cage (7, 8, 9). Neonatally handled rats exhibit decreased stress reactivity in adulthood (10, 11, 12, 13, 14) due to an increased density of glucocorticoid receptors in the hippocampus (7, 13).

Neonatally handled rats also have an altered feeding behavior, demonstrating an increased consumption of palatable food when exposed to it for short periods (15, 16). In our previous study, we described a sex-specific protective influence of neonatal handling on abdominal fat deposition in females after a chronic exposure to chocolate (17). Moreover, neonatally handled rats are also less vulnerable to alterations in cerebral Na^+ , K^+ -ATPase activity and S100B protein levels induced by chronic chocolate intake (18).

Cholinesterases (ChEs) are enzymes that catalyze the hydrolysis of choline esters (19), being important in terminating the activation of the cholinergic system, both in the brain and periphery. Two ChEs are present in vertebrates: acetylcholinesterase (AChE; E.C 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C 3.1.1.8). BuChE is present in several tissues, including serum, liver, heart, vascular endothelia, and the nervous system (19). A strong line of evidence supports an association between serum butyrylcholinesterase activity with

parameters of adiposity, the serum lipid profile and the degree of insulin resistance (20-27). Increased butyrylcholinesterase activity in serum has been suggested to be the first sign of increased triglycerides and lipoprotein metabolism (28). In addition, cholinesterase activities have also been shown to be affected by exposure to stress or glucocorticoids: both GCs and stress exposure decreased serum butyrylcholinesterase activity, with little effect on cerebral acetylcholinesterase activity (29, 30, 31).

This study used a protocol of chronic exposure to a highly palatable, highly caloric diet (chocolate) and withdrawal of this diet to better understand how early life handling affects the preference for palatable foods and protects against abdominal obesity in adult female rats. We hypothesized that neonatally handled animals are less vulnerable to the metabolic effects of a chronic highly palatable diet exposure, as well as, to its withdrawal. In addition, in an attempt to understand possible mechanisms involved in these findings, cerebral acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase activities were determined both during the chronic highly palatable diet and thereafter.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subjects:

Pregnant Wistar rats bred at our animal facility were randomly selected. Animals were single-housed in home cages made of Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust and were maintained in a controlled environment: standard dark/light cycle (lights on between 07:00 h and 19:00 h), temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cage cleaning once a week, food and water provided *ad libitum*. All litters were culled within 24 h of birth to eight pups and maintained intact except for handling procedures, which were carried out between 09:00h and

11:00h. The researcher changed gloves between manipulations of each litter to avoid the spread of any kind of odor from nest to nest.

The day of birth was considered as day 0. Litters were weaned and separated by sex on postnatal day 21. Two female pups were used per litter per group from the 4 groups (see below). After weaning, rats were housed four to five per cage, and maintained undisturbed in a controlled environment (as described above) until starting the exposure to highly palatable food (day 60). Forty-eight female rats were used in the different experiments, derived from 15 different litters. A timeline is provided for the experiments (Figure 1). All animal procedures were approved by the Institutional Ethical Committee (Ethical Committee, UFRGS).

Neonatal Handling model:

Non-handled group: Pups were left undisturbed with the dam until weaning. Routine cage cleaning was suspended during this period.

Handled group: This procedure was carried out as described previously (17). The dam was gently pulled to one side of the cage and the pups were removed from their home cage and placed into a clean cage lined with clean paper towels. The litter was then placed in an incubator set to maintain an ambient temperature of 30-32°C (warm water at 34° C). After 10 minutes, pups were returned to their dams. The whole litter was handled altogether (males and females), however after weaning males were used in a different project. This procedure was performed from day 1 to 10 following birth, and pups were then left undisturbed until postnatal day 21.

Exposure to palatable food:

Starting on day 60 of life, female rats were habituated to the new food. Animals were placed individually in a lightened rectangular box (40 x 15 x 20 cm) with floor and side walls made of wood and a glass ceiling. A previously weighed amount of chocolate (milk chocolate ® – Neugebauer) was offered during 3 min each day, for 5 days, under food restriction (receiving about 80% of habitual ingestion). On the 6th day, rats were tested for the consumption of palatable food, having received lab chow ad libitum for the previous 24 hours. These procedures were performed to verify whether the animals would eat chocolate as they usually ingest other types of palatable food (15), both with and without food restriction. After this habituation period, the animals received rat chow ad libitum. On the 83rd day of life all animals were weighed and randomized to different groups that were housed in 3 to 4 per cage. The groups were subdivided into 1) Non-handled + standard lab chow, 2) Non-handled + chocolate + standard lab chow, 3) Handled + standard lab chow and 4) Handled + chocolate + standard lab chow. One week later, those groups assigned to receive chocolate, with standard chow ad libitum, started to receive chocolate ad libitum in the homecage (on the grid, outside the cage). During 30 days, previously weighed amounts of chocolate and standard lab chow were offered, and the remaining amount was measured each day to evaluate the consumption. Food consumption was measured per cage and then divided by the number of animals per cage to determine mean consumption per animal. Nutritional composition of the diets per 100g of food used in the study is the following: standard lab chow (290 Kcal., CHO 56g; Protein 22g; Fat 4.5g) and chocolate (544 kcal., CHO 64g; Protein 4.4g; Fat 30.4g). Detailed food and chocolate consumption, as well as chocolate preference data, have already been published (17), and were reproduced in this subset of animals. To estimate the preference for chocolate over standard lab chow, we divided the amount of

kilocalories derived from chocolate by the total caloric intake. A group of animals (n= 24 rats) was then sacrificed by decapitation after 6 hours of fasting.

Response to chocolate withdrawal:

After chronic exposure to chocolate, a subset of the specific groups of female rats were deprived of chocolate for 30 days, receiving only standard lab chow and water *ad libitum*. After 7 days of chocolate deprivation, we tested if neonatally handled animals would still eat more chocolate than non-handled as they did before the chronic chocolate exposure, and we did that by exposing them to chocolate again for a very short period of time (3 minutes). Afterwards, the rats were again chocolate deprived for 23 more days. Rats were weighed during the first 24 hours and on the last (30th) day of chocolate deprivation.

Blood collection, brain and abdominal fat dissection:

Rats were sacrificed after 6 hours of fasting. Chow was removed at 7:00 h (at the beginning of the light period); fasting was done during the day to minimize the possibility that the rats ate close to tissue collection. Trunk blood was collected into heparinized tubes for triglycerides (TG) determination. Plasma was separated and frozen at minus 20°C until the day of analysis. Another aliquot of the blood was collected, centrifuged for 10 min at 1000 × g, and serum was used to measure butyrylcholinesterase activity.

After decapitation, the brain was quickly removed. Cerebral cortex was dissected, homogenized (1:10 v/v in 500 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5) and centrifuged at 1000 × g for 10 min. The supernatant was used for the enzymatic (acetylcholinesterase) analysis. Protein concentration was 0.5-0.7 mg/ml, determined according to Bradford (32).

The two major portions of abdominal fat (gonadal and retroperitoneal adipose tissue depots) were dissected. Abdominal fat tissue was weighed using a scale with a precision of 0.0001g.

Plasma triglycerides and cholinesterase activity assays:

Plasma triglycerides were measured with commercial kits (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Cerebral acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase activities were measured according to the method of Ellman and colleagues (33), with modifications. Hydrolysis rates (v) were measured at acetylthiocholine (S) concentrations of 0.8 mM in 1mL assay solutions with 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB) at 25°C. Fifty microliters of rat serum or cerebral cortex supernatant were added to the reaction mixture and preincubated for 3 min. The hydrolysis was monitored by formation of the thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2-3 min (intervals of 30s). All samples were run in duplicate. Specific enzyme activity was expressed as $\mu\text{mol ASCh per hour per milligram of protein}$.

Statistical analysis:

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean, and were analyzed by Two-Way (caloric intake, body weight, abdominal fat deposition, plasma triglycerides, serum butyrylcholinesterase and cerebral acetylcholinesterase activities) or Repeated Measures (chocolate preference) ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when indicated, or by Student's t test (feeding behavior). Significance levels for all measures were set at $P < 0.05$. The number of animals used was estimated from previous experiments (16, 17).

RESULTS

Consumption and body weight gain during chronic chocolate exposure and after withdrawal

The consumption of the diets during the 30-day-period (chronic exposure) demonstrated no difference between non-handled and neonatally handled females, considering the mean consumption of each cage (data not shown). Figures 2A and 2B display chow and chocolate consumption in the first week of treatment (Repeated Measures ANOVA, $P>0.05$ for handling, and $P<0.001$ for diet, $n= 5-9$ cages/group). Both groups equally presented a decrease in the preference for chocolate over time (Repeated Measures ANOVA, $P=0.001$, $n= 4-5$ cages/group), without interactions. As expected, groups receiving chocolate had a higher total caloric intake, compared to the groups receiving just chow (Two-Way ANOVA, $P<0.001$, $n= 5-9$ cages/group), without effect of neither neonatal handling nor interaction. Food preference for blocks of 6 days during the 30-day-period of chocolate exposure is displayed in Table 1. Seven days after chocolate withdrawal, handled females showed higher chocolate rebound consumption in comparison to non-handled rats (Student's t test, $P=0.011$, $n=13-16$ rats/group, Figure 3).

Mean initial body weight was not different between handled and non-handled animals (Student's t test, $P>0.05$, $n= 10-16$ rats/group). All groups increased body weight over time during the chocolate exposure (Repeated Measures ANOVA, $P<0.001$, $n= 10-16$ rats/group); as expected, there was an interaction between time and diet ($P=0.018$), since weight gain was more evident in the groups receiving chocolate (Two-Way ANOVA, $P=0.001$, $n= 10-16$ rats/group). An interaction between time x group x diet almost reached significance ($P=0.056$), meaning that handled female rats receiving chocolate gained more weight in

comparison to non-handled ones over time. Figure 4A displays weight gain during 30 days of this diet.

During the first 24 hours of chocolate deprivation, both neonatally handled and non-handled groups lost weight, although there was an effect of the group (Student's t test, $P < 0.001$, $n = 13-16$ rats/group), showing that neonatally handled females presented a more evident decrease in body weight (Figure 4B). At the end of the 30-day-period of chocolate deprivation, body weight gain did not differ between the groups and there was no effect of the diet, nor interaction (Figure 4C).

Abdominal fat after chronic chocolate exposure and withdrawal

Fat deposition was expressed in relation to the body weight. As expected, groups receiving chocolate showed more abdominal fat deposition (Two-Way ANOVA, $P < 0.001$, $n = 9-12$ rats/group). An interaction between group and diet ($P = 0.028$) was also observed: non-handled females receiving chocolate exhibited a 60% increased abdominal fat, while handled animals demonstrated a smaller increase (14%). When inguinal and perirenal fat deposition were individually evaluated, it was observed that the increase induced by the diet was mainly in inguinal fat (data not shown). Interestingly, after 30 days of chocolate withdrawal, abdominal fat deposition was still greater in non-handled rats that received chocolate (Two-Way ANOVA, interaction between group x diet, $P = 0.016$, $n = 6-15$ rats/group), without an isolated effect of the group or diet. These results are displayed in Figures 5A and 5B.

Plasma triglycerides after chronic chocolate exposure and withdrawal

The consumption of chocolate increased plasma triglycerides (Two-Way ANOVA, $P=0.019$, $n= 7-11$ rats/group), without effect of the group or interaction. After chocolate withdrawal, there was an expressive decrease in triglyceride levels, reaching concentrations of lower than those of controls (Two-Way ANOVA, $P=0.018$, $n= 12-16$ rats/group), without any effect of the group or interaction (Figures 6A and 6B).

Serum butyrylcholinesterase and cerebral acetylcholinesterase activities after chronic chocolate exposure and withdrawal

When examining serum butyrylcholinesterase activity, we observed an interaction between group and diet, showing that chocolate consumption led to an increase in serum butyrylcholinesterase activity of non-handled rats (Two-Way ANOVA, $P=0.028$, $n= 5-6$ rats/group). However, after 30 days of chocolate withdrawal, the difference between the groups was no longer detectable (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet, $n= 6$ rats/group), and no interaction was observed. Figures 7A and 7B display these results.

With regard to cerebral acetylcholinesterase activity, there was no difference between groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet, $n= 5-7$ rats/group) or interaction, after chronic exposure to the palatable diet. However, after the chocolate withdrawal period, there was a decrease in cerebral acetylcholinesterase activity in both neonatally handled and non-handled groups (Two-Way ANOVA, $P=0.011$, $n= 5$ rats/group). These results are shown in Figures 8A and 8B.

DISCUSSION

The main findings of the current study purposed that an early environmental intervention can modulate behavioral and metabolic effects of chronic exposure to a highly palatable diet in adulthood. We observed that neonatally handled rats recovered their increased palatable food intake when they are exposed to it after a short period of chocolate withdrawal. In addition, these animals exhibited an attenuated increase in abdominal fat deposition and in serum butyrylcholinesterase activity after a long-term exposure to highly palatable food.

Neonatally handled female rats increased chocolate consumption in comparison to non-handled females after 7 days of chocolate withdrawal. It is well established that handled animals have an increased consumption of highly palatable food (16, 17); similarly to previous reports of long-term exposure to palatable diet (17, 34), the preference for chocolate tended to decrease over time in both handled and non-handled female rats. Therefore, it could be suggested that handled animals chronically exposed to a highly palatable diet are able to inhibit their inherent preference and decrease the consumption of this type of food if exposed to it chronically, which would be in accordance with our previous data (17). It is also important to consider that this palatable food was offered to the animals in addition to rat chow, both *ad libitum*. Moreover, they recover their preference for this food after a few days of withdrawal. Being less prone to suffer the metabolic effects of this type of diet, these animals seem to have a particular ability to manage their natural increased preference for palatable food, depending on the previous meals and on the food availability.

One possible explanation for this is the well-documented decrease in responsiveness to stress in handled rats (10, 13). It has been shown that the balance between glucocorticoids and insulin has a fundamental role in regulating palatable food consumption and energy storage

(35). Although not statistically significant, the mean increase in body weight in neonatally handled rats is actually smaller than in non-handled ones. It is possible that handled animals have a differential balance between these hormones, in which an increased preference is seen accompanying a better strategy to deal with a caloric overload. This would be in accordance with the recent description that high intake of palatable food in rats predicts binge-eating independently of the susceptibility to obesity (36). In the current study, handled animals seem to be prone to binge-eating but this is not correlated with an increased susceptibility to excessive body weight gain, possibly due to a particular hormonal balance involved in energy intake and expenditure.

In our study, all groups increased their body weight gain over time, especially those chronically exposed to chocolate, as expected (37). Twenty-four hours of chocolate withdrawal decreased body weight in both groups, as also described previously (37), but the effect was more evident in neonatally handled animals. This finding suggests that handled animals might have a greater sensibility to chocolate withdrawal, in comparison to non-handled animals, since total caloric intake did not differ between the groups. It has been shown that withdrawal from exposure to a chronic highly palatable diet reverses the decreased glucose tolerance and hyperinsulinemia, but not the increased pancreatic islet blood perfusion induced by the diet (38). It is possible that a differential susceptibility to the effects of the diet in the handled rats may lead to a specific modulation of appetite and energy expenditure through peripheral signals, such as insulin and leptin.

Another explanation for the greater decrease in body weight, in handled compared to non-handled animals, after twenty-four hours of chocolate withdrawal may be a failure in the metabolic adaptation of these animals, due to the absence of the palatable food. It has been established that highly caloric diets induce alterations in the metabolic rate of glucose utilization (39) and oxidative stress (39, 40). Other approaches demonstrate increases in UCP-

1, Mc4R and CART gene expression, as an immediate result of highly caloric diet consumption (41), and it is possible that these two groups (handled and non-handled animals) demonstrate differences in these diet-induced alterations. In the current study, acute body weight loss in handled animals indicates a particular vulnerability of these animals when they are challenged with chocolate withdrawal during a period of few hours. It is possible that body weight in handled rats is more immediately affected by diet withdrawal than in non-handled animals, as a result of an inadequate maintenance of their metabolic response. Alternatively, since handled rats have a higher consumption of sweet food in comparison to non-handled animals, this withdrawal could lead to more frustration, at least when they are acutely challenged. However, this result deserves further investigation.

In this study, we show that neonatal handling is associated with an attenuated abdominal fat accumulation in female rats chronically exposed to a palatable diet, confirming previous findings (17). In addition, after 30 days of chocolate withdrawal, handled animals still demonstrated less abdominal fat than non-handled animals, suggesting that handled animals do not carry some of the persistent effects of the palatable diet to the same extent that non-handled animals do. Since glucocorticoids modulate the production of leptin by the adipose tissue (42), it is possible that a differential peripheral tissue sensitivity to glucocorticoids and, consequently, alterations in plasma leptin and/or in its central action are involved. Although we did not see differences in baseline measurements of leptin between handled and non-handled males in previous studies (16), other groups have reported differences in baseline and stress-induced plasma leptin between handled and non-handled animals (12).

Chronic exposure to chocolate increased plasma triglycerides, as expected (43). Previously, no differences were observed in basal insulin, glucose and glucocorticoids between handled and non-handled animals (17). In addition, 30 days of chocolate withdrawal

was enough time to decrease plasma triglycerides in neonatally handled and non-handled rats, with both groups reaching lower values than their respective controls. This was surprising, as another study shows that plasma triglycerides return to baseline after withdrawal of a chronic highly palatable diet (44). However, the authors used a period of seven weeks between the discontinuation of the diet and triglycerides evaluation, which may account for the differences between the two studies. Another explanation to this effect on triglyceride levels after chocolate withdrawal might be an overcompensation as a result of the chronic chocolate exposure, however, as far as is our knowledge, there is no study demonstrating this finding, therefore, this effect deserves more investigation.

Serum butyrylcholinesterase activity was increased in non-handled rats after long-term exposure to chocolate, but not in handled ones. This is an interesting finding, because it has been reported that serum butyrylcholinesterase activity is positively associated with risk factors for cardiovascular disease, such as insulin resistance, plasma triglycerides and body fat deposition (21, 22, 23, 45). Although we did not observe a difference in plasma triglycerides between the groups, an evident difference in relation to abdominal fat deposition was found, which may agree with the above statement. Therefore, it is possible that neonatally handled rats do not develop abdominal obesity and this is related to the lack of increase in serum butyrylcholinesterase activity seen in these animals when compared to non-handled rats. Interestingly, a recent paper demonstrates that the use of albumin-BChE prevented cocaine-induced reinstatement of drug seeking in rats (46). Although the authors demonstrate that albumin-BChE administration does not influence food-rewarded behavior or impulsivity for food, they used regular chow and not palatable pellets for their testing. Facing the similarities between drug addiction and palatable food eating (47), it is possible that a lack of increase in serum butyrylcholinesterase activity in neonatally handled rats after chronic chocolate

exposure is related with the reinstatement of the preference for chocolate seen in this group after the 7 days withdrawal period.

Even though chocolate consumption did not affect cerebral acetylcholinesterase activity, chocolate withdrawal decreased the enzyme activity in both handled and non-handled rats. Interestingly, the use of AChE inhibitors has been reported to have anti-withdrawal properties in a model of morphine dependence (48) and to attenuate the self-administration of low-dose cocaine as well as non-drug reinforcers (49). Therefore, it is possible that the decreased cerebral acetylcholinesterase activity seen after chocolate withdrawal is a coping strategy to deal with the absence of the palatable food, or a natural reaction to the withdrawal of the highly palatable food. Another interesting finding is that the AChE activity in brain cell cultures varies according to the exposure to plasma from fed or fasted animals (50), suggesting that a meal related factor may play a role in our findings, as well.

Regarding acetylcholine (the substrate of cholinesterases) some evidences have demonstrated increases in central acetylcholine levels after food intake (51, 52). In addition, acetylcholine levels in the brain can also be affected by the body weight gain (52). Interestingly, a recent case report describes a woman with anorexia nervosa with a clinical myogenic syndrome form mimicking myasthenia gravis, completely reversed by chocolate intake (53). Although the mechanisms were not clear, it is possible that acetylcholine is involved.

In summary, neonatally handled animals recover their preference for palatable food after a short period of withdrawal, and this is accompanied by maintenance in the pattern of serum butyrylcholinesterase activity. These animals also lose more weight and do not accumulate abdominal fat as much nor as persistently as non-handled animals. Supposing that these animal model's findings could be translated into humans, one could propose that early life events could potentially affect feeding behavior persistently (54). On the other hand,

neonatal rearing conditions also influence the susceptibility to the damaging effects of being chronically exposed to palatable food, or to its withdrawal. In an era of high prevalence of obesity and prompt availability of palatable food, the knowledge that early experiences can determine an individual's vulnerability and resilience to nutritional challenges in adulthood may be of interest to propose insights into prevention and therapies.

REFERENCES

1. Lesage, J.; Blondeau, B.; Grino, M.; Breant, B.; Dupouy, J.P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*. 2001, 142:1692-1702.
2. O'Regan, D.; Kenyon, C.J.; Seckl, J.R.; Holmes, M.C. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004, 287:E863-870.
3. Barker, D.J. In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci. (Lond)*. 1998, 95:115-128.
4. Seckl, J.R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol.* 2004, 151 Suppl 3:U49-62.
5. Jones, A.; Godfrey, K.M.; Word, P.; Osmond, C.; Goulden, P.; Phillips, D.I. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 91:1868-1871.

6. Tsigos, C.; Chrousos, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 2002, 53:865-871.
7. Liu, D.; Diorio, J.; Tannenbaum, B.; Caldji, C.; Francis, D.; Freedman, A.; Sharma, S.; Pearson, D.; Plotsky, P.M.; Meaney, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997, 277:1659-1662.
8. Branchi, I.; Santucci, D.; Alleva, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav. Brain. Res.* 2001, 125:49-56.
9. Pryce, C.R.; Bettschen, D.; Feldon, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev. Psychobiol.* 2001, 38:239-251.
10. Levine, S.; Haltmeyer, G.C.; Karas, G.G.; Denenberg, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol. Behav.* 1967, 2:55-59.
11. Padoin, M.J.; Cadore, L.P.; Gomes, C.M.; Barros, H.M.; Lucion, A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav. Neurosci.* 2001, 115:1332-1340.
12. Panagiotaropoulos, T.; Papaioannou, A.; Pondiki, S.; Prokopiou, A.; Stylianopoulou, F.; Gerozissis, K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology.* 2004, 79:109-118.
13. Meaney, M.J.; Aitken, D.H.; Sharma, S.; Viau, V.; Sarrieau, A. Postnatal handling increases hippocampal type II glucocorticoid receptors and enhances adrenocorticoid negative feedback efficacy in the rat. *Neuroendocrinology.* 1989, 50:597-604.

14. Ladd, C.O.; Thirivikraman, K.V.; Huot, R.L.; Plotsky, P.M. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology*. 2005, 30:520-533.
15. Silveira, P.P.; Portella, A.K.; Clemente, Z.; Bassani, E.; Tabajara, A.S.; Gamaro, G.D.; Dantas, G.; Torres, I.L.; Lucion, A.B.; Dalmaz, C. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav*. 2004, 80:739-745.
16. Silveira, P.P.; da Silva Benetti, C.; Ayres, C.; Pederiva, F.Q.; Portella, A.K.; Lucion, A.B.; Dalmaz, C. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav. Brain. Res*. 2006, 173:205-210.
17. da S Benetti, C.; Silveira, P.P.; Portella, A.K.; Diehl, L.A.; Nunes, E.; de Oliveira, V.S.; Dalmaz, C.; Goldani, M.Z. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr. Res*. 2007, 62:405-411.
18. da S Benetti, C.; Silveira, P.P.; Matté, C.; Stefanello, F.M.; Leite, M.C.; Gonçalves, C.A.; Wyse, A.T.; Dalmaz, C.; Goldani, M.Z. Effects of a chronic exposure to a highly palatable diet and its withdrawal, in adulthood, on cerebral Na⁺,K⁺-ATPase and plasma S100B in neonatally handled rats. *Int. J. Dev. Neurosci*. 2010, 28:153-159.
19. Mack, A.; Robitzki, A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol*. 2000, 60:607-628.
20. Alcantara, V.M.; Chautard-Freire-Maia, E.A.; Scartezini, M.; Cerci, M.S.; Braun-Prado, K.; Picheth, G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 2002, 62:399-404.

21. Calderon-Margalit, R.; Adler, B.; Abramson, J.H.; Gofin, J.; Kark, J.D. Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Clin. Chem.* 2006, 52:845-852.
22. Valle, A.; O'Connor, D.T.; Taylor, P.; Zhu, G.; Montgomery, G.W.; Slagboom, P.E.; Martin, N.G.; Whitfield, J.B. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clin. Chem.* 2006, 52:1014-1020.
23. Iwasaki, T.; Yoneda, M.; Nakajima, A.; Terauchi, Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern. Med.* 2007, 46:1633-1639.
24. Muacević-Kataneca, D.; Bradamante, V.; Reinec, Z.; Sucić, M.; Poljicanin, T.; Busljeta, I.; Metelko, Z. Clinical study on the effect of simvastatin on butyrylcholinesterase activity. *Arzneimittelforschung.* 2005, 55:271-275.
25. Lucić Vrdoljak, A.; Bradamante, V.; Radić, B.; Peraica, M.; Fuchs, R.; Reiner, Z. Butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in dexamethasone treated rats. *Acta Pharm.* 2005, 55:177-185.
26. Kálmán, J.; Juhász, A.; Rakonczay, Z.; Abrahám, G.; Zana, M.; Boda, K.; Farkas, T.; Penke, B.; Janka, Z. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. *Life Sci.* 2004, 75:1195-1204.
27. Rustemeijer, C.; Schouten, J.A.; Voerman, H.J.; Beynen, A.C.; Donker, A.J.; Heine, R.J. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? *Clin. Sci. (Lond).* 2001, 101:29-35.

28. Bradamante, V.; Krnić, Z.; Zrinski, R.; Konjevoda, P.; Reiner, Z. Changes in butyrylcholinesterase activity and serum lipids after oxprenolol and glibenclamide treatments in non-diabetic rats. *Arzneimittelforschung*. 2006, 56:64-69.
29. Servatius, R.J.; Ottenweller, J.E.; Guo, W.; Beldowicz, D.; Zhu, G.; Natelson, B.H. Effects of inescapable stress and treatment with pyridostigmine bromide on plasma butyrylcholinesterase and the acoustic startle response in rats. *Physiol. Behav.* 2000, 69:239-246.
30. Weber, U.; Brank, M.; Grubic, Z. Glucocorticoids differentially control synthesis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat liver and brain. *Chem. Biol. Interact.* 1999, 119-120:341-347.
31. Verjee, Z.H.; Behal, R.; Ayim, E.M. Effect of glucocorticoids on liver and blood cholinesterases. *Clin. Chim. Acta.* 1977, 81:41-46.
32. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72:248-254.
33. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.J.R.; Feather-Stone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7:88-95.
34. Teegarden, S.L.; Bale, T.L. Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. *Physiol. Behav.* 2008, 93:713-723.
35. Dallman, M.F.; Warne, J.P.; Foster, M.T.; Pecoraro, N.C. Glucocorticoids and insulin both modulate caloric intake through actions on the brain. *J. Physiol.* 2007, 583:431-436.

36. Boggiano, M.M.; Artiga, A.I.; Pritchett, C.E.; Chandler-Laney, P.C.; Smith, M.L.; Eldridge, A.J. High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: an animal model of lean vs obese binge-eating and obesity with and without binge-eating. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2007, 31:1357-1367.
37. Armitage, G.; Hervey, G.R.; Rolls, B.J.; Rowe, E.A.; Tobin, G. The effects of supplementation of the diet with highly palatable foods upon energy balance in the rat. *J. Physiol*. 1983, 342:229-251.
38. Svensson, A.M.; Hellerström, C.; Jansson, L. Diet-induced obesity and pancreatic islet blood flow in the rat: a preferential increase in islet blood perfusion persists after withdrawal of the diet and normalization of body weight. *J. Endocrinol*. 1996, 151:507-511.
39. Diniz, Y.S.; Fernandes, A.A.; Campos, K.E.; Mani, F.; Ribas, B.O.; Novelli, E.L. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food. Chem. Toxicol*. 2004, 42:313-319.
40. Matsuzawa, N.; Takamura, T.; Kurita, S.; Misu, H.; Ota, T.; Ando, H.; Yokoyama, M.; Honda, M.; Zen, Y.; Nakanuma, Y.; Miyamoto, K.; Kaneko, S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007, 46:1392-1403.
41. Archer, Z.A.; Rayner, D.V.; Duncan, J.S.; Bell, L.M.; Mercer, J.G. Introduction of a high-energy diet acutely up-regulates hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript, Mc4R and brown adipose tissue uncoupling protein-1 gene expression in male Sprague-Dawley rats. *J. Neuroendocrinol*. 2005, 17:10-17.

42. Yoshida, T.; Hayashi, M.; Monkawa, T.; Saruta, T. Regulation of obese mRNA expression by hormonal factors in primary cultures of rat adipocytes. *Eur. J. Endocrinol.* 1996, 135:619-625.
43. Akiyama, T.; Tachibana, I.; Shirohara, H.; Watanabe, N.; Otsuki, M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1996, 31:27-35.
44. Naderali, E.K.; Fatani, S.; Williams, G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. *Atherosclerosis.* 2004, 172:63-69.
45. Randell, E.W.; Mathews, M.S.; Zhang, H.; Seraj, J.S.; Sun, G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin. Biochem.* 2005, 38:799-805.
46. Brimijoin, S.; Gao, Y.; Anker, J.J.; Gliddon, L.A.; Lafleur, D.; Shah, R.; Zhao, Q.; Singh, M.; Carroll, M.E. A cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase selectively blocks cocaine toxicity and reinstatement of drug seeking in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2008, [Epub ahead of print].
47. Avena, N.M.; Rada, P.; Hoebel, B.G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008, 32:20-39.
48. Buccafusco, J.J.; Zhang, L.C.; Shuster, L.C.; Jonnala, R.R.; Gattu, M. Prevention of precipitated withdrawal symptoms by activating central cholinergic systems during a dependence-producing schedule of morphine in rats. *Brain. Res.* 2000, 852:76-83.

49. Grasing, K.; He, S.; Yang, Y. Dose-related effects of the acetylcholinesterase inhibitor tacrine on cocaine and food self-administration in rats. *Psychopharmacology. (Berl)*. 2008, 196:133-142.
50. Shambaugh, G.E. 3rd; Koehler, R.R.; Radosevich, J.A. Nutrition and fetal brain maturation. II. Impact of maternal starvation on changing levels of acetylcholinesterase and enolase in vitro. *Exp. Cell. Res.* 1988, 175:344-353.
51. Hajnal, A.; Pothos, E.N.; Lénárd, L.; Hoebel, B.G. Effects of feeding and insulin on extracellular acetylcholine in the amygdala of freely moving rats. *Brain. Res.* 1998, 785:41-48.
52. Avena, N.M.; Rada, P.; Hoebel, B.G. Underweight rats have enhanced dopamine release and blunted acetylcholine response in the nucleus accumbens while bingeing on sucrose. *Neuroscience*. 2008, 156:865-71.
53. Dupond, J.L.; Meaux-Ruault, N.; Hafsaoui, C.; Gil, H.; Curlier, E.; Fery-Blanco, C.; Magy-Bertrand, N. Pseudo-myasthenic myopathy in a woman with anorexia nervosa. *Rev. Med. Interne*. 2007, 28:793-95.
54. Barbieri, M.A.; Portella, A.K.; Silveira, P.P.; Bettiol, H.; Agranonik, M.; Silva, A.A.; Goldani, M.Z. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr. Res.* 2009, 65:215-20.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Timeline of treatments schedule: PND, postnatal day; PD, palatable diet (chocolate).

Figure 2: Standard lab chow and chocolate consumption in handled and non-handled adult female rats during the first week of treatment. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (A) Mean rat chow consumed. (B) Mean chocolate consumed. \square NH_chow; \blacksquare NH_chocolate; Δ H_chow; \blacktriangle H_chocolate. Repeated measures ANOVA showed an effect of diet ($P < 0.001$). $N = 5-9$ cages/group. \square non-handling; \blacksquare handling.

Figure 3: Feeding behavior, expressed as mean \pm S.E.M of chocolate consumed/rat during acute exposure to this type of food after 7 days of chocolate deprivation. $N = 13-16$ rats/group. Handled female rats consumed more chocolate during this short period of exposure than non-handled rats (Student's t test, $P = 0.011$).

Figure 4: Body weight gain during chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of body weight gain during chronic chocolate exposure. $N = 10-16$ rats/group. Chocolate consumption increased body weight gain (Two-Way ANOVA, $P = 0.001$). (B) Mean \pm S.E.M of body weight gain/lost after the first 24h of chocolate deprivation. $N = 13-16$ rats/group. Neonatally-handled females presented a more evident decrease in the body weight (Student's t test, $P < 0.001$). (C) Mean \pm S.E.M of body weight gain after a 30-day-period of chocolate deprivation. $N = 13-16$ rats/group. Body weight gain did not differ between the groups (Student's t test, $P > 0.050$).

Figure 5: Abdominal fat deposition after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of abdominal fat/body weight ratio after chronic chocolate exposure. $N= 9-12$ rats/group. Chocolate consumption increased abdominal fat deposition (Two-Way ANOVA, $P<0.001$). There was an interaction between group x diet ($P=0.028$). (B) Mean \pm S.E.M of abdominal fat/body weight ratio after chocolate deprivation. $N= 6-15$ rats/group. Abdominal fat deposition was still increased after chocolate deprivation in non-handled rats that had received chocolate (Two-Way ANOVA, interaction between group x diet, $P=0.016$).

Figure 6: Plasma triglyceride levels after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation. (A) Mean \pm S.E.M of plasma triglyceride levels after chronic chocolate exposure. $N= 7-11$ rats/group. Chocolate consumption increased triglyceride levels (Two-Way ANOVA, $P=0.019$). (B) Mean \pm S.E.M of plasma triglyceride levels after chocolate deprivation. $N= 12-16$ rats/group. After a 30-day-period of chocolate deprivation, rats presented a decrease in triglyceride levels (Two-Way ANOVA, $P=0.018$).

Figure 7: Serum butyrylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation. (A) Mean \pm S.E.M of serum butyrylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure. $N= 5-6$ rats/group. Chocolate consumption led to an increase in the serum butyrylcholinesterase activity in non-handled rats (interaction between group x diet, Two-Way ANOVA, $P=0.028$). (B) Mean \pm S.E.M of serum butyrylcholinesterase activity after chocolate deprivation. $N= 6$ rats/group. After 30 days of chocolate deprivation, this activity did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

Figure 8: Cerebral acetylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation. (A) Mean \pm S.E.M of cerebral acetylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure. $N= 5-7$ rats/group. During chocolate consumption, cerebral acetylcholinesterase activity did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of cerebral acetylcholinesterase activity after chocolate deprivation. $N= 5$ rats/group. After chocolate deprivation, this activity was decreased in handled and non-handled female rats (Two-Way ANOVA, $P=0.011$).

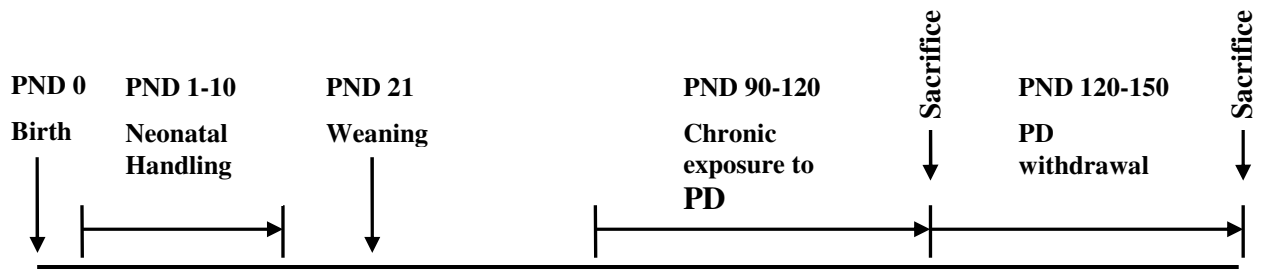


Figure 1: Timeline of treatments schedule: PND, postnatal day; PD, palatable diet (chocolate).

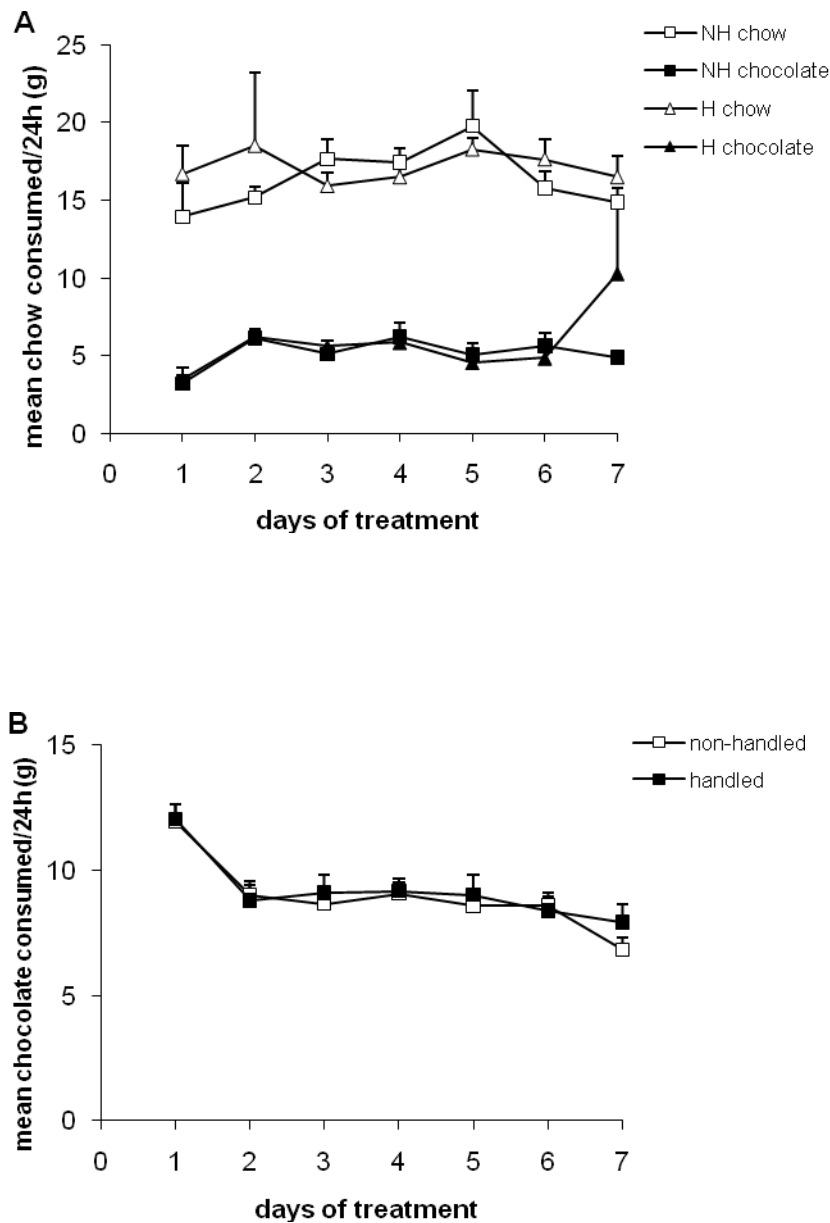


Figure 2: Standard lab chow and chocolate consumption in handled and non-handled adult female rats during the first week of treatment. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (A) Mean rat chow consumed. (B) Mean chocolate consumed. \square NH_chow; \blacksquare NH_chocolate; \triangle H_chow; \blacktriangle H_chocolate. Repeated measures ANOVA showed an effect of diet ($P < 0.001$). $N = 5-9$ cages/group. \square non-handling; \blacksquare handling.

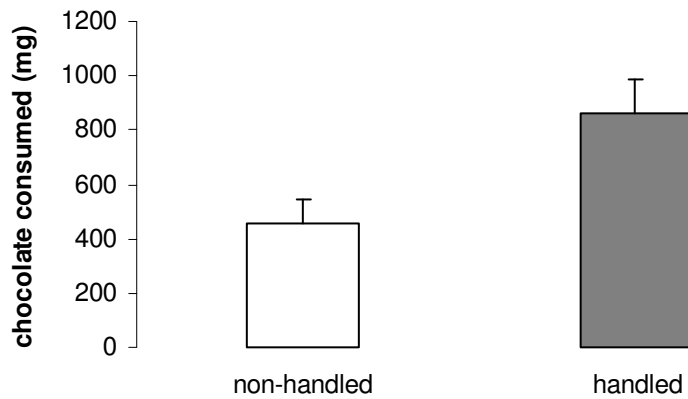


Figure 3: Feeding behavior, expressed as mean \pm S.E.M of chocolate consumed/rat during acute exposure to this type of food after 7 days of chocolate deprivation. $N= 13-16$ rats/group. Handled female rats consumed more chocolate during this short period of exposure than non-handled rats (Student's t test, $P=0.011$).

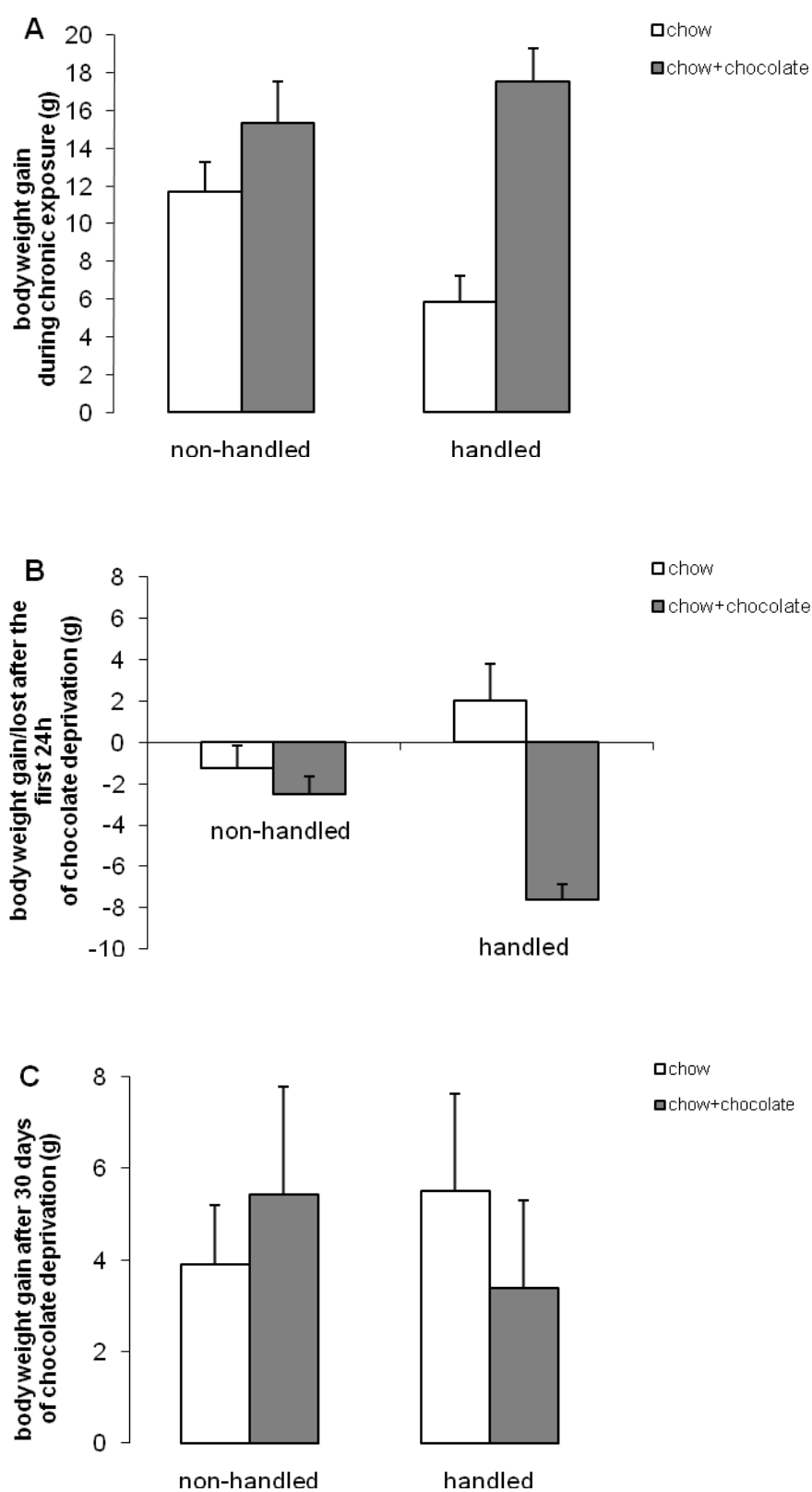


Figure 4: Body weight gain during chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of body weight

gain during chronic chocolate exposure. $N= 10-16$ rats/group. Chocolate consumption increased body weight gain (Two-Way ANOVA, $P=0.001$). (B) Mean \pm S.E.M of body weight gain/lost after the first 24h of chocolate deprivation. $N= 13-16$ rats/group. Neonatally-handled females presented a more evident decrease in the body weight (Student's t test, $P<0.001$). (C) Mean \pm S.E.M of body weight gain after a 30-day-period of chocolate deprivation. $N= 13-16$ rats/group. Body weight gain did not differ between the groups (Student's t test, $P>0.050$).

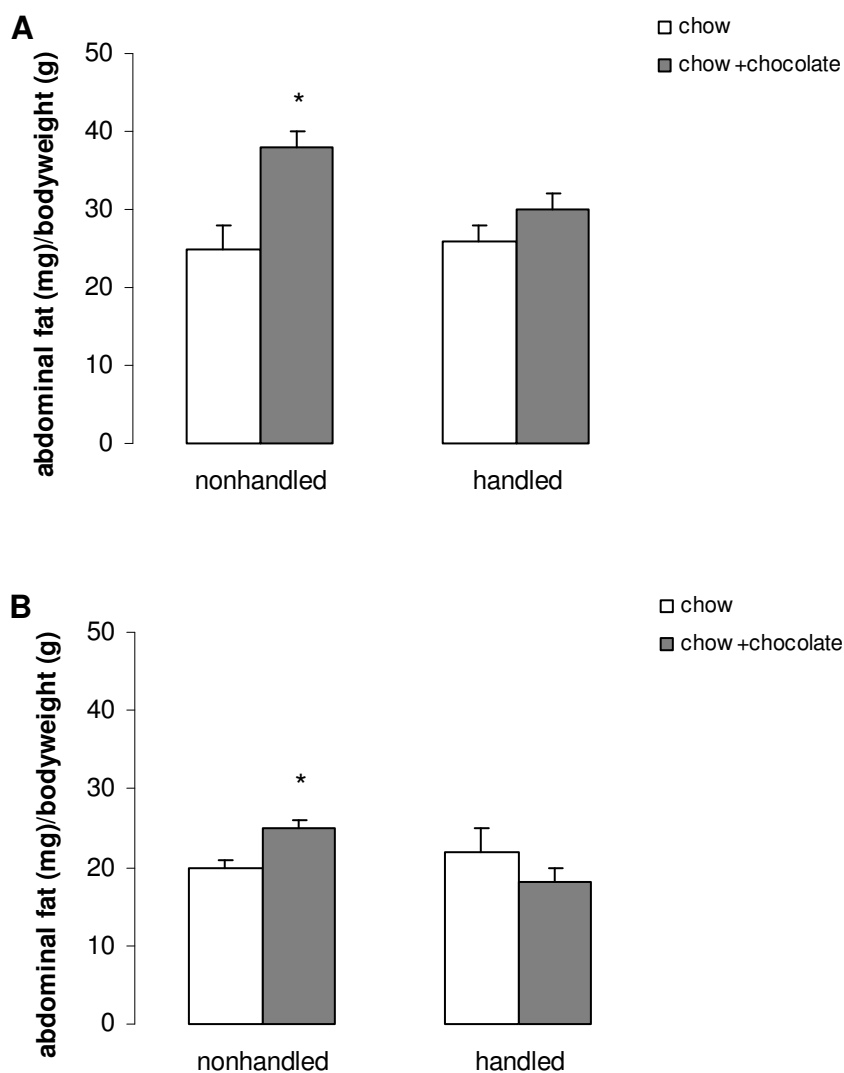


Figure 5: Abdominal fat deposition after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of abdominal fat/body weight ratio after chronic chocolate exposure. $N= 9-12$ rats/group. Chocolate consumption increased abdominal fat deposition (Two-Way ANOVA, $P<0.001$). There was an interaction between group \times diet ($P=0.028$). * Significantly different from all other groups (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of abdominal fat/body weight ratio after chocolate deprivation. $N= 6-15$ rats/group. Abdominal fat deposition was still increased after chocolate deprivation in non-handled rats that had received chocolate (Two-

Way ANOVA, interaction between group x diet, $P=0.016$). * Significantly different from handled group (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$).

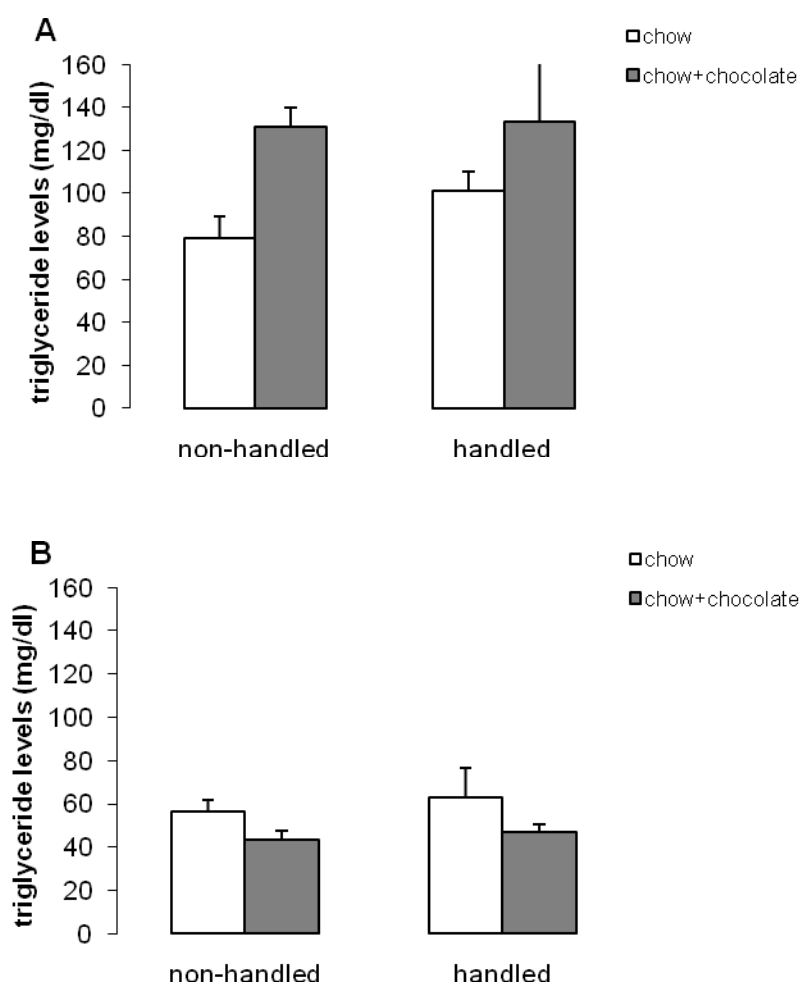


Figure 6: Plasma triglyceride levels after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation. (A) Mean \pm S.E.M of plasma triglyceride levels after chronic chocolate exposure. $N= 7-11$ rats/group. Chocolate consumption increased triglyceride levels (Two-Way ANOVA, $P=0.019$). (B) Mean \pm S.E.M of plasma triglyceride levels after chocolate deprivation. $N= 12-16$ rats/group. After a 30-day-period of chocolate deprivation, rats presented a decrease in triglyceride levels (Two-Way ANOVA, $P=0.018$).

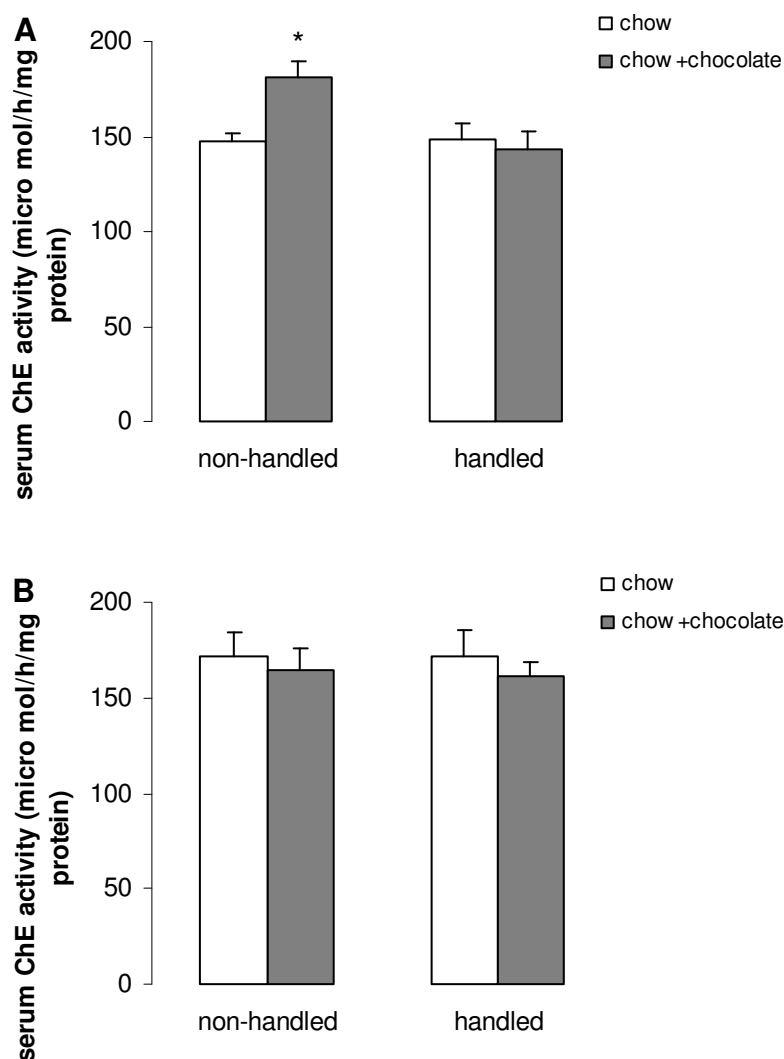


Figure 7: Serum butyrylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation. (A) Mean \pm S.E.M of serum butyrylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure. $N= 5-6$ rats/group. Chocolate consumption led to an increase in the serum butyrylcholinesterase activity in non-handled rats (interaction between group x diet, Two-Way ANOVA, $P=0.028$). (B) Mean \pm S.E.M of serum butyrylcholinesterase activity after chocolate deprivation. $N= 6$ rats/group. After 30 days of chocolate deprivation, this activity did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

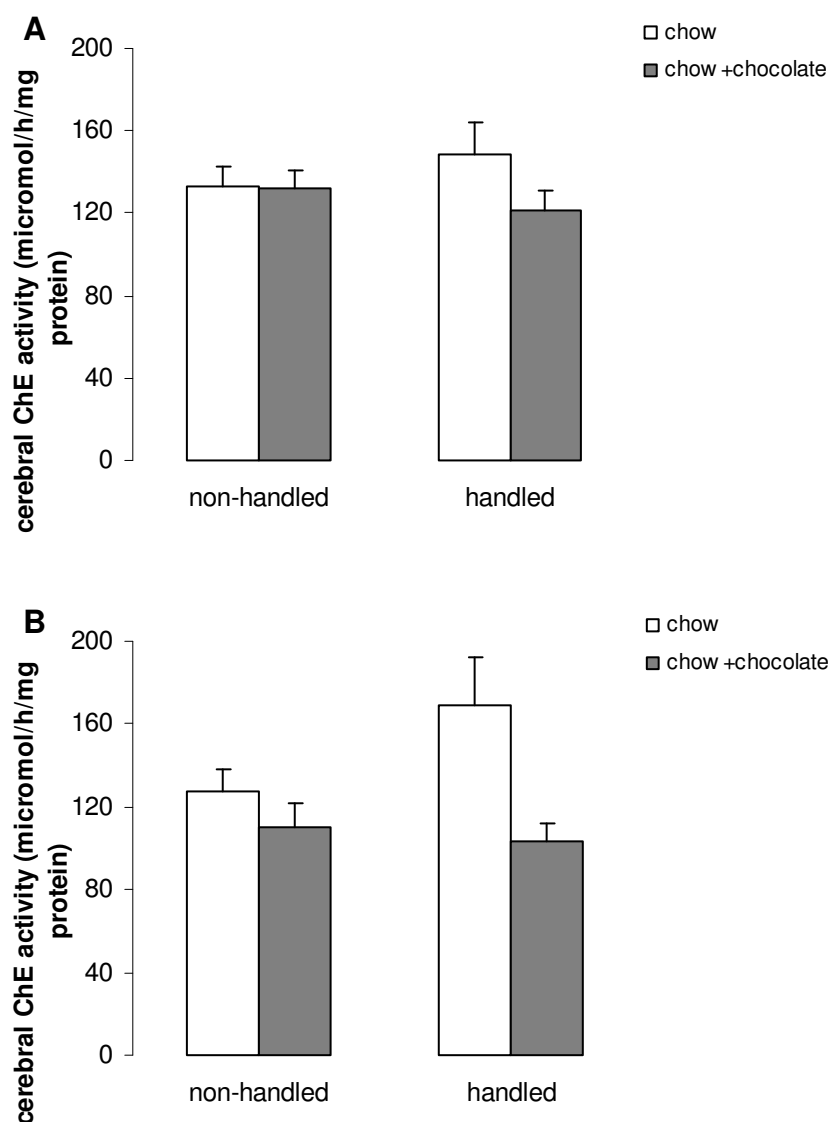


Figure 8: Cerebral acetylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure followed by chocolate deprivation. (A) Mean \pm S.E.M of cerebral acetylcholinesterase activity after chronic chocolate exposure. $N= 5-7$ rats/group. During chocolate consumption, cerebral acetylcholinesterase activity did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of cerebral acetylcholinesterase activity after chocolate deprivation. $N= 5$ rats/group. After chocolate deprivation, this activity was decreased in handled and non-handled female rats (Two-Way ANOVA, $P=0.011$).

Table 1. Macronutrient composition of the diets / 100g of food used in the study.

CHO, carbohydrates.

Foods	Kcalories	CHO (g)	Protein (g)	Fat (g)	Fiber (g)
Standard rat chow	290	56	22	4.5	4.92
Chocolate	544	64	4.4	30.4	0

Table 2. Chocolate preference of handled and non-handled female rats during the 30-day-period of exposure to the palatable diet.

Group	Day 1	Day 6	Day 12	Day 18	Day 24	Day 30
Non-handled	0.88 \pm 0.02	0.75 \pm 0.04	0.72 \pm 0.05	0.74 \pm 0.02	0.72 \pm 0.02	0.70 \pm 0.01
Handled	0.85 \pm 0.01	0.75 \pm 0.03	0.74 \pm 0.04	0.74 \pm 0.02	0.73 \pm 0.02	0.70 \pm 0.04

Data are shown as mean \pm standard error of the mean. $N = 4-5$ cages/group. Chocolate preference decreased over time (Repeated Measures ANOVA, effect of time, $P=0.001$, $n=4-5$ cages/group).

Título: Uma intervenção no ambiente neonatal altera a vulnerabilidade aos efeitos metabólicos da exposição crônica a uma dieta palatável na vida adulta.

Título resumido: Manipulação neonatal e metabolismo.

Autores: Carla S. Benetti^{1,4}; Patrícia P. Silveira^{1,4}, André K. Portella^{1,4}; Cristiane Matté³; Francieli M. Stefanello³; Angela T. S. Wyse³; Carla Dalmaz^{2,3}; Marcelo Z. Goldani^{1,4}.

¹PPG Saúde da Criança e do Adolescente, FAMED, UFRGS (postal code: 90035-003), ²PPG Neurociências, ICBS, UFRGS (90046-900), ³Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS (90035-003) e ⁴Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS (90035-903). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Endereço de contato: Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco

90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Fone: 051- 3359-8515

Fax: 051- 3359-8001

Email: mgoldani@hcpa.ufrgs.br (Goldani, MZ).

Suporte Financeiro: CNPq, Capes and FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00.

RESUMO

Estudos prévios demonstram que intervenções ambientais precoces influenciam o consumo de alimento palatável e o depósito de gordura abdominal em ratas fêmeas expostas cronicamente a uma dieta hipercalórica na vida adulta. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos metabólicos da exposição crônica a uma dieta palatável (chocolate) e a resposta a sua retirada em animais adultos manipulados e não-manipulados durante o período neonatal. Foram avaliados o consumo de alimentos (ração padrão e chocolate), o ganho de peso corporal, o depósito de gordura abdominal, os níveis de triglicerídeos no plasma, assim como a atividade das colinesterases no soro e no córtex cerebral durante a exposição crônica ao alimento palatável e após a privação desse tipo de alimento em ratas fêmeas adultas expostas ou não à manipulação neonatal (10 min/dia, 10 primeiros dias de vida). Animais manipulados durante o período neonatal consumiram mais chocolate após 7 dias de privação a esse tipo de alimento quando comparados com animais controle, esses animais também demonstraram uma redução no peso corporal após as primeiras 24 horas de privação de chocolate. Ratas fêmeas não manipuladas no período neonatal e cronicamente expostas ao chocolate na vida adulta demonstraram maior depósito de gordura abdominal em comparação com fêmeas manipuladas e esse efeito persistiu após 30 dias de privação ao chocolate. O consumo de chocolate induziu um aumento na atividade da colinesterase no soro em animais não manipulados, mas não em animais manipulados, e esse efeito desapareceu após 30 dias de privação ao chocolate. A abstinência de chocolate reduziu a atividade da colinesterase cerebral nos dois grupos (manipulados e não manipulados). A reunião desses achados sugere que a manipulação nos primeiros 10 dias de vida modula a preferência por alimento palatável e induz uma resposta metabólica específica que pode ser mais adaptativa em comparação com animais não manipulados no período neonatal.

Palavras-chave: ambiente neonatal, manipulação neonatal, comportamento alimentar, alimento palatável, depósito de gordura abdominal, colinesterase, abstinência.

Abreviaturas: **BuChE**, butirilcolinesterase, **AChE**, acetilcolinesterase, **ChE**, colinesterase, **HPA**, hipotálamo-pituitária-adrenal.

INTRODUÇÃO

Relatos prévios têm demonstrado que o ambiente precoce está associado com alterações endócrino-metabólicas em animais (1, 2) e humanos (3) mais tarde na vida. Além disso, foi sugerido que essas associações podem ser mediadas pela programação da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (4, 5), um dos principais sistemas envolvidos na resposta ao estresse (6).

Considerando as várias abordagens experimentais propostas, a manipulação neonatal consiste em um modelo de pesquisa adequado para avaliar os efeitos de uma intervenção precoce sobre desfechos diversos na vida adulta. Este protocolo se caracteriza por uma breve, repetida e aparentemente inócua separação materna durante o período neonatal e é descrito por induzir um aumento no cuidado maternal imediatamente após o retorno dos filhotes a caixa-moradia (7, 8, 9). Animais manipulados no período neonatal demonstram uma reduzida reatividade ao estresse quando adultos (10, 11, 12, 13, 14) devido a uma maior densidade dos receptores para glicocorticóides (GCs) no hipocampo (7, 13).

A manipulação neonatal também altera o comportamento alimentar, onde se observa um maior consumo de alimentos palatáveis quando animais manipulados são expostos a esse tipo de alimento por curtos períodos de tempo (15, 16). Em nosso estudo anterior, foi descrito um efeito protetor gênero-específico da manipulação neonatal sobre o depósito de gordura abdominal em ratas fêmeas adultas cronicamente expostas ao chocolate (17). Também identificamos que ratas manipuladas no período neonatal são menos vulneráveis a alterações na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase cerebral, bem como nos níveis da proteína S100B, induzidos pelo consumo crônico de chocolate (18).

Colinesterases (ChEs) são enzimas que catalizam a hidrólise do neurotransmissor acetil-colina em ésters de colina (19), sendo fundamental para que o neurônio colinérgico

retorne ao seu estado de repouso após a ativação no cérebro bem como na periferia. Duas classes de ChEs estão presentes nos vertebrados: acetilcolinesterase (AChE; E.C 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE; E.C 3.1.1.8). A BuChE está presente em vários tecidos incluindo soro, fígado, coração, endotélio vascular e sistema nervoso (19). Evidências de associação entre a atividade da ChE no soro e parâmetros de adiposidade, perfil de lipídios no plasma e o grau de resistência à insulina têm sido descritas (20-27). A atividade aumentada da ChE no soro foi sugerida por ser o primeiro sinal de aumento nos níveis de triglicerídios e no metabolismo de lipoproteínas (28). Adicionalmente, a atividade das ChEs é afetada pela exposição ao estresse ou aos glicocorticóides: os GCs assim como a exposição ao estresse diminuem a atividade da ChE no soro e um pequeno efeito na atividade da ChE cerebral foi demonstrado (29, 30, 31).

O presente estudo utilizou um protocolo de exposição crônica a uma dieta palatável e hipercalórica (chocolate), bem como a retirada espontânea dessa dieta com o objetivo de melhor compreender de que maneira a manipulação precoce afeta a preferência por alimentos palatáveis e protege contra o desenvolvimento de obesidade abdominal em ratas fêmeas adultas. Nossa hipótese foi de que animais manipulados no período neonatal são menos vulneráveis aos efeitos metabólicos da exposição crônica a uma dieta palatável assim como a sua retirada. Além disso, na tentativa de entender os possíveis mecanismos envolvidos nestes achados, foram determinadas as atividades das colinesterases no córtex cerebral e no soro durante a exposição crônica à dieta palatável e após a sua retirada.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Animais:

Ratas Wistar prenhes provenientes do Instituto de Biociências (UFRGS) foram randomicamente selecionadas. Os animais foram colocados individualmente em caixas-moradia confeccionadas em *Plexiglas* (65 x 25 x 15 cm) com piso coberto por maravalha e foram mantidos em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12h (luzes acesas entre 07:00 h e 19:00 h), temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, limpeza semanal das caixas, ração padrão e água *ad libitum*. Todas as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes nas primeiras 24h após o nascimento e mantidas intactas, exceto para os procedimentos de manipulação que foram realizados entre às 09:00h e 11:00h. O pesquisador tinha o cuidado de trocar as luvas entre a manipulação de cada ninhada, para evitar a dispersão de qualquer tipo de odor de uma ninhada para outra.

O dia do nascimento foi considerado o dia 0 (zero). As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no dia 21 pós-natal. Foram utilizadas duas fêmeas da mesma ninhada para o mesmo grupo, considerando os 4 grupos (ver abaixo). Após o desmame, as ratas fêmeas foram mantidas em torno de quatro a cinco por caixa, em ambiente controlado (conforme descrito acima) e sem qualquer tipo de manipulação até o início da exposição ao alimento palatável (dia 60). Um total de 48 ratas fêmeas foi utilizado em diferentes experimentos, sendo essas derivadas de 15 ninhadas. A linha do tempo esquematiza os experimentos (Figura 1). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

Modelo de Manipulação Neonatal:

Grupo não-manipulado: Filhotes permaneceram com a mãe, sem manipulação neonatal, até o desmame. A limpeza rotineira das caixas foi interrompida durante esse período.

Grupo manipulado: Este procedimento foi realizado conforme anteriormente descrito (17). A mãe foi gentilmente afastada para um lado da caixa-moradia e os filhotes foram removidos do ninho e colocados dentro de uma caixa limpa forrada com papel toalha. Então, a ninhada foi colocada em uma incubadora ajustada para manter uma temperatura ambiente de 30-32°C (temperatura da água de 34° C), enquanto a mãe foi mantida na caixa-moradia posicionada ao lado da incubadora. Após 10 minutos, os filhotes (machos e fêmeas) retornaram para sua respectiva mãe. Toda a ninhada foi manipulada ao mesmo tempo (machos e fêmeas), entretanto, após o desmame, machos foram utilizados em outro experimento. Este procedimento foi realizado do dia 1 ao dia 10 pós-natal, em seguida, os filhotes foram mantidos com a mãe, sem manipulação, até o dia 21 pós-natal.

Exposição ao alimento palatável:

A partir do dia 60 de vida, as ratas foram habituadas a um novo ambiente contendo um alimento novo. Neste experimento, as fêmeas foram colocadas individualmente em uma caixa retangular (40 x 15 x 20 cm) com partes inferior e laterais revestidas em madeira e parte superior em vidro transparente. Uma porção de chocolate pesada previamente (chocolate ao leite – Neugebauer®) foi colocada em uma das extremidades da caixa-corredor. As ratas foram habituadas a esse ambiente por 5 dias, durante 3 minutos cada dia, sob restrição alimentar (recebendo em torno de 80% do consumo habitual). No 6° dia, as ratas foram

testadas para o consumo de alimento palatável, após terem recebido ração padrão *ad libitum* nas 24 horas prévias. Esses procedimentos foram realizados para verificar se as ratas fêmeas comeriam o chocolate da mesma forma que elas comumente ingerem outros tipos de alimentos palatáveis (15), com e sem restrição alimentar. Após esse período de habituação, as ratas receberam ração padrão *ad libitum*. No 83º dia de vida, todas as ratas foram pesadas e randomizadas em diferentes grupos, sendo colocadas em números de 3 a 4 por caixa. Os grupos foram subdivididos em 1) Não-manipulada + ração padrão, 2) Não-manipulada + chocolate + ração padrão, 3) Manipulada + ração padrão e 4) Manipulada + chocolate + ração padrão. Uma semana depois, grupos específicos começaram a receber chocolate, com ração padrão, *ad libitum* na caixa-moradia. Durante 30 dias, porções previamente pesadas de chocolate e de ração padrão foram oferecidas e a quantidade restante foi medida diariamente para avaliar o consumo. O consumo de alimentos foi medido por caixa e então dividido pelo número de animais em cada caixa para determinar o consumo médio por animal. Segue abaixo a descrição da composição nutricional das dietas por 100g de alimento utilizado no estudo: ração-padrão (290 kcal., HC 56g; Proteína 22g; Gordura 4,5g) e chocolate (544 kcal., HC 64g; Proteína 4,4g; Gordura 30,4g). O consumo de ração e chocolate, assim como os dados de preferência pelo alimento palatável foram descritos em detalhes previamente (17) e foram reproduzidos neste estudo. A preferência pelo chocolate foi estimada através da razão entre a quantidade de calorias provenientes do chocolate e o consumo calórico total. Passados 30 dias de exposição à dieta palatável, um grupo de animais (n= 24 ratas) foi sacrificado por decapitação após 6 horas de jejum.

Resposta à privação de chocolate:

Após a exposição crônica ao chocolate, um grupo específico de ratas fêmeas foi privado de chocolate durante 30 dias, recebendo somente ração padrão e água *ad libitum*. Após 7 dias de privação de chocolate, nós testamos se as ratas manipuladas ainda comeriam mais chocolate que as não-manipuladas assim como quando foram testadas antes da exposição crônica ao chocolate. Para isso, as ratas foram novamente expostas ao chocolate durante um curto período de 3 minutos e o consumo foi medido. Em seguida, as ratas foram privadas de chocolate por mais 23 dias. Elas foram pesadas durante as primeiras 24 horas e no último dia (30º dia) de abstinência de chocolate.

Amostras de sangue, dissecação de estruturas cerebrais e gordura abdominal:

Os animais foram sacrificados após 6h de jejum. A ração padrão foi removida às 7:00h (início do ciclo claro); o jejum foi realizado durante o dia para minimizar a possibilidade dos animais consumirem algum alimento próximo ao horário da coleta dos tecidos. O sangue do tronco encefálico foi coletado em tubos contendo anti-coagulante (heparina) para a determinação de triglicerídios (TG). O plasma foi separado e congelado a - 20°C até o dia das análises. Uma outra alíquota de sangue foi coletada, centrifugada a 1000 × g por 10 minutos e o soro foi utilizado para determinar a atividade da enzima colinesterase.

O cérebro foi removido imediatamente após a decapitação. O córtex cerebral foi dissecado, homogeneizado (1:10 v/v em 500 mM solução tampão de fosfato de potássio, pH 7,5) e centrifugado a 1000 × g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a análise enzimática (acetilcolinesterase). A concentração da proteína foi 0,5-0,7 mg/ml, determinada pelo método de Bradford (32).

As duas maiores porções da gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas. O tecido de gordura abdominal foi pesado utilizando uma balança com precisão de 0,0001g.

Determinação de triglicerídios no plasma e atividade das colinesterases:

Os níveis de triglicerídios no plasma foram determinados utilizando um kit comercial (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). A atividade das colinesterases, no soro e córtex cerebral, foi determinada pelo método de Ellman e colaboradores (33), com modificações. As taxas de hidrólise (v) foram medidas em concentrações de acetilticolina (ASCh) de 0,8 mM em 1mL de soluções de ensaio com 100 mM de tampão fosfato, pH 7,5, e 1,0 mM 5,5'-Ditiobis-(2-ácido nitrobenzólico) (DTNB) a 25°C. 50 μ L de soro ou de sobrenadante de córtex cerebral foram adicionados à solução reagente e pré-incubados durante 3 minutos. A hidrólise foi monitorada através da formação do di-ânion tiolato de DTNB em 412 nm por 2-3 minutos (intervalos de 30s). Todas as amostras foram realizadas em duplicatas. A atividade da enzima foi expressa em μ mol ASCh hidrolisada por hora por miligrama de proteína.

Análise Estatística:

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA de duas vias (consumo calórico, peso corporal, depósito de gordura abdominal, triglicerídios no plasma, atividade da butirilcolinesterase e da acetilcolinesterase) ou ANOVA de medidas repetidas (preferência pelo chocolate), seguidas pelo teste post-hoc de Duncan quando indicado, ou por teste t de *Student* (comportamento alimentar). O nível de

significância estatística estabelecido foi de 5%. O número de animais utilizado foi estimado a partir de experimentos prévios (16, 17).

RESULTADOS

Consumo e ganho de peso corporal durante exposição crônica ao chocolate e após privação deste alimento

O consumo das dietas durante o período de 30 dias (exposição crônica) não diferiu entre animais manipulados e não-manipulados no período neonatal, considerando o consumo médio por caixa (dados não mostrados). As figuras 2A e 2B apresentam o consumo de chocolate na primeira semana de exposição à dieta (ANOVA de medidas repetidas, $P>0,05$ para manipulação e $P<0,001$ para dieta, $n= 5-9$ caixas/grupo). Ratas manipuladas assim como não-manipuladas nos primeiros dias pós-natal apresentaram uma diminuição na preferência pelo chocolate ao longo do tempo de exposição (ANOVA de medidas repetidas, $P=0,001$, $n= 4-5$ caixas/grupo), nenhuma interação foi observada. Conforme esperado, os grupos que receberam chocolate demonstraram uma maior ingestão calórica total quando comparados com os grupos que receberam somente ração padrão (ANOVA de duas vias, $P<0,001$, $n= 5-9$ caixas/grupo), sem efeito da manipulação neonatal nem interações. A preferência pelo alimento palatável, medida em blocos de 6 dias durante o período de 30 dias de exposição ao chocolate, está demonstrada na Tabela 1. Após sete dias de privação de chocolate, ratas fêmeas manipuladas exibiram um maior consumo rebote de chocolate em comparação com as não-manipuladas (teste t de *Student*, $P=0,011$, $n= 13-16$ animais/grupo, Figura 3).

O peso basal médio não foi diferente entre as ratas manipuladas e não-manipuladas (teste t de *Student*, $P>0,05$, $n= 10-16$ ratas/grupo). Todos os grupos aumentaram o peso corporal com o passar do tempo de exposição ao chocolate (ANOVA de medidas repetidas,

$P < 0,001$, $n = 10-16$ animais/grupo); conforme esperado, uma interação entre tempo e dieta ($P = 0,018$) foi observada, mostrando um ganho de peso mais evidente nos grupos que receberam chocolate (ANOVA de duas vias, $P = 0,001$, $n = 10-16$ ratas/grupo). Uma interação entre tempo x grupo x dieta quase alcançou significância estatística ($P = 0,056$), demonstrando que ratas fêmeas manipuladas que receberam chocolate ganharam mais peso corporal ao longo do tempo quando comparadas com ratas não-manipuladas. Figura 4A exibe o ganho de peso corporal durante os 30 dias de exposição à dieta.

Durante as primeiras 24h de privação de chocolate animais manipulados bem como animais não-manipulados no período neonatal perderam peso corporal, porém um efeito do grupo (teste t de *Student*, $P < 0,001$, $n = 13-16$ ratas/grupo) mostrou que ratas fêmeas manipuladas têm uma redução mais evidente no peso corporal (Figura 4B). Ao final do período de 30 dias de privação de chocolate, o ganho de peso corporal não diferiu entre os grupos e não foi observado efeito da dieta nem interação (Figura 4C).

Gordura abdominal após exposição crônica ao chocolate e após privação deste alimento

O depósito de gordura abdominal foi expresso em relação ao peso corporal dos animais. Conforme esperado, os grupos que receberam chocolate mostraram um maior acúmulo de gordura abdominal (ANOVA de duas vias, $P < 0,001$, $n = 9-12$ animais/grupo). Uma interação entre grupo e dieta foi observada ($P = 0,028$) demonstrando que animais não-manipulados recebendo chocolate tinham um aumento de 60% na gordura abdominal, enquanto que animais manipulados demonstraram um aumento mais discreto (14%). Quando os depósitos de gordura inguinal e perirenal foram avaliados individualmente, observou-se que o aumento induzido pela dieta foi principalmente na gordura inguinal (dados não

mostrados). Após 30 dias de privação de chocolate, o depósito de gordura abdominal permaneceu aumentado nos animais não-manipulados que receberam chocolate (ANOVA de duas vias, interação entre grupo x dieta, $P=0,016$, $n= 6-15$ animais/grupo), sem efeito isolado do grupo ou dieta. Estes resultados são apresentados nas Figuras 5A e 5B.

Níveis de triglicerídios no plasma após exposição crônica ao chocolate e após privação deste alimento

O consumo de chocolate induziu um aumento nos níveis de triglicerídios plasmáticos (ANOVA de duas vias, $P=0,019$, $n= 7-11$ ratas/grupo), porém nenhum efeito do grupo ou interação foi observado. Após o período de privação de chocolate, uma redução expressiva nos níveis de triglicerídios foi observada, alcançando concentrações mais baixas que as de animais controles (ANOVA de duas vias, $P=0,018$, $n= 12-16$ ratas/grupo), sem efeito do grupo ou interação (Figuras 6A e 6B).

Atividade da colinesterase no soro e no cérebro após exposição crônica ao chocolate e após privação deste alimento

No que se refere à atividade da colinesterase no soro, foi observada uma interação entre grupo e dieta, mostrando que o consumo de chocolate induziu um aumento na atividade da enzima no soro de ratas fêmeas não-manipuladas no período neonatal (ANOVA de duas vias, $P=0,028$, $n= 5-6$ ratas/grupo). Entretanto, após 30 dias de privação de chocolate, esta diferença entre os grupos não alcançou significância estatística (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para grupo e dieta, $n= 6$ ratas/grupo). As Figuras 7A e 7B mostram estes resultados.

Quando analisamos a atividade da colinesterase cerebral, não havia diferença entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$ para grupo e dieta, $n = 5-7$ ratas/grupo) nem interação após a exposição crônica a dieta palatável. No entanto, após o período de privação de chocolate, foi observada uma diminuição na atividade da colinesterase cerebral em ratas manipuladas bem como em não-manipuladas durante o período neonatal (ANOVA de duas vias, $P = 0,011$, $n = 5$ ratas/grupo). Estes achados estão dispostos nas Figuras 8A e 8B.

DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo propõem que uma intervenção ambiental precoce pode modular os efeitos comportamentais e metabólicos da exposição crônica a uma dieta hiperpalatável na vida adulta. Observamos que ratas fêmeas adultas manipuladas no período neonatal recuperam seu consumo aumentado de alimento palatável quando são novamente expostas a esse tipo de alimento, após um curto período de abstinência. Essas ratas também exibiram um aumento atenuado no depósito de gordura abdominal e na atividade da butirilcolinesterase após exposição a longo-prazo ao alimento palatável.

Ratas fêmeas manipuladas no período neonatal demonstraram um consumo de chocolate aumentado em comparação com fêmeas não-manipuladas após 7 dias de privação de este tipo de alimento. Investigações prévias demonstram que animais manipulados, quando adultos, consomem mais alimentos palatáveis que animais não-manipulados (16, 17). De forma semelhante a relatos anteriores de exposição a longo prazo à dieta palatável (17, 34), nosso estudo demonstrou que a preferência pelo chocolate tende a diminuir com o passar do tempo de exposição em ambos os grupos de animais manipulados e não-manipulados. Dessa forma, poderíamos sugerir que animais manipulados expostos cronicamente a uma dieta palatável são capazes de inibir sua herdada preferênica por alimentos palatáveis e diminuir o

consumo do alimento preferido se expostos cronicamente a este tipo de alimento, o que estaria de acordo com nossos achados anteriores (17). É importante considerar que no presente estudo o alimento palatável foi oferecido adicionalmente à ração padrão e que os animais receberam ambas as dietas *ad libitum*. Além disso, os animais manipulados recuperam sua preferência pelo alimento palatável após um curto período de privação deste tipo de alimento. Sendo esses animais menos propensos a sofrer os efeitos metabólicos da exposição crônica à dieta palatável, animais manipulados parecem ter uma habilidade particular para administrar sua preferência, naturalmente aumentada, por alimento palatável, dependendo da disponibilidade deste alimento.

Uma possível explicação para este achado é a diminuída resposta ao estresse classicamente descrita em animais manipulados nos primeiros dias de vida (10, 13). Existem relatos de que o balanço entre glicocorticóides e insulina tem um papel fundamental na regulação do consumo de alimento palatável e do estoque de energia (35). Apesar de não ter atingido significância estatística, o aumento médio do peso corporal nas ratas manipuladas foi menor que nas ratas não-manipuladas no período neonatal. Assim, é possível que animais manipulados durante os primeiros dias de vida tenham um balanço diferencial entre esses hormônios, onde uma preferência aumentada pelo alimento palatável é observada juntamente com uma melhor estratégia para lidar com uma sobrecarga calórica. Esta abordagem estaria de acordo com uma recente descrição de que o elevado consumo de alimento palatável prediz, em animais, o comportamento de comer compulsivo independentemente da susceptibilidade à obesidade (36). No presente estudo, animais manipulados parecem ser propensos ao comportamento de comer compulsivo, porém este comportamento não está correlacionado com uma susceptibilidade aumentada para o ganho de peso excessivo, possivelmente devido a um particular balanço hormonal envolvido no consumo e no gasto de energia.

Na presente investigação, todos os grupos apresentaram um aumento no ganho de peso corporal ao longo do tempo, principalmente os animais expostos cronicamente à dieta palatável, conforme o esperado (37). Após as primeiras 24h de privação de chocolate foi observada uma redução do peso corporal nos animais manipulados assim como nos não-manipulados, corroborando com achados prévios (37), porém esse efeito foi mais evidente nos animais manipulados no período neonatal. Tal achado sugere que animais manipulados podem ter uma maior sensibilidade à retirada do chocolate quando comparados com animais não-manipulados, visto que o consumo calórico total não foi diferente entre os grupos. Foi descrito que a interrupção da exposição crônica a uma dieta palatável reverte a tolerância à glucose diminuída e a hiperinsulinemia, mas não reverte a aumentada perfusão sanguínea nas ilhotas pancreáticas induzida pela dieta palatável (38). Dessa forma, é possível que uma susceptibilidade diferencial aos efeitos da dieta nas ratas manipuladas possa induzir uma modulação específica do apetite e do gasto energético através de sinais periféricos, incluindo hormônios como a insulina e a leptina.

Uma outra explicação para a maior redução do peso corporal nos animais manipulados em comparação com os não-manipulados, após as primeiras 24h de privação de chocolate, seria uma falha na adaptação metabólica destes animais em razão da ausência do alimento palatável. Existem relatos de que dietas altamente calóricas induzem alterações na taxa metabólica de utilização da glicose (39) e no estresse oxidativo (39, 40). Outras abordagens demonstram aumentos na expressão gênica de proteínas como UCP-1, Mc4R e CART como um resultado imediato do consumo de uma dieta hipercalórica (41), dessa maneira, é possível que animais manipulados e não-manipulados demonstrem diferenças nestas alterações induzidas pela dieta. No presente estudo, a perda de peso aguda observada nas ratas manipuladas indica uma vulnerabilidade particular destes animais quando esses são desafiados com a privação do alimento palatável durante um período de poucas horas.

Possivelmente, o peso corporal das ratas fêmeas manipuladas seja mais imediatamente afetado pela abstinência da dieta palatável que em ratas não-manipuladas, como o resultado de uma inadequada manutenção da resposta metabólica. Visto que animais manipulados exibem um aumentado consumo de alimento doce em comparação com animais não-manipulados, sugere-se que esta privação do alimento palatável poderia induzir uma maior frustração nestes animais, pelo menos quando os mesmos são expostos agudamente ao alimento doce. Entretanto, esses achados merecem maior investigação.

O presente estudo também mostrou que a manipulação neonatal está associada com um atenuado depósito de gordura abdominal em ratas fêmeas cronicamente expostas à dieta palatável, o que confirma nossos achados prévios (17). Além disso, após 30 dias de privação de chocolate, ratas manipuladas ainda demonstravam um menor acúmulo de gordura abdominal quando comparadas com ratas não-manipuladas, sugerindo que animais manipulados não carregam alguns dos efeitos persistentes da dieta palatável na mesma extensão que animais não-manipulados. Considerando que os glicocorticóides modulam a produção de leptina pelo tecido adiposo (42) é possível que uma sensibilidade diferencial do tecido aos glicocorticóides e, conseqüentemente, alterações na leptina plasmática e/ou na sua ação central estejam envolvidos nesse efeito. Embora um estudo prévio de nosso laboratório não tenha observado diferença nos níveis basais de leptina no plasma de ratos machos manipulados e não-manipulados no período neonatal (16), outros investigadores relataram diferenças nos níveis plasmáticos de leptina basal bem como induzido por estresse entre animais manipulados e não-manipulados (12).

Conforme esperado, a exposição crônica ao chocolate aumentou os níveis de triglicerídios no plasma (43). Em nossas investigações anteriores, nenhuma diferença foi observada nos níveis basais de insulina, glicose e glicocorticóides em animais manipulados e não-manipulados (17). No presente estudo, um período 30 dias de privação de chocolate foi

suficiente para reduzir os níveis de triglicerídios no plasma de ratas manipuladas e não-manipuladas e ambos os grupos alcançaram níveis mais baixos que seus respectivos controles. Esse foi um achado surpreendente e vai de encontro com relatos de que os triglicerídios no plasma retornam aos seus níveis basais após interrupção da exposição crônica à uma dieta palatável (44). No entanto, tais autores utilizaram um período de sete semanas entre a interrupção da dieta e a determinação dos triglicerídios no plasma, o que poderia contribuir para as diferenças encontradas entre os dois estudos. Outra explicação para esse efeito sobre os níveis de triglicerídios, após a abstinência de chocolate, poderia ser uma supercompensação como um resultado da exposição crônica ao chocolate. Contudo, até o presente momento, não existe nenhuma evidência demonstrando esse achado, dessa forma, investigações futuras são necessárias para elucidar tal efeito.

Observamos um aumento da atividade da butirilcolinesterase no soro de ratas não-manipuladas após a exposição a longo prazo ao chocolate, porém esse efeito não foi detectado nas ratas manipuladas. Esse achado é bastante interessante, pois estudos relatam que a atividade da butirilcolinesterase no soro está positivamente associada com fatores de risco para doença cardiovascular, tais como resistência à insulina, níveis elevados de triglicerídios no plasma e acúmulo de gordura corporal (21, 22, 23, 45). Embora nosso estudo não tenha detectado uma diferença nos níveis de triglicerídios plasmáticos entre os grupos, uma diferença evidente em relação ao depósito de gordura abdominal foi observada, o que pode estar em concordância com a afirmação acima. Assim, é possível que ratas manipuladas no período neonatal não desenvolvam obesidade abdominal e isso esteja relacionado com a falta de aumento na atividade da butirilcolinesterase no soro dessas ratas quando comparadas com ratas não-manipuladas. Interessantemente, um estudo recente demonstrou que o uso de BChE (butirilcolinesterase)-albumina conjugada preveniu a reincidência (*reinstatement*) pela busca de uma droga de abuso induzida por cocaína em ratos (46). Apesar dos autores demonstrarem

que a administração de BChE-albumina não influencia o comportamento de recompensa pelo alimento ou a impulsividade pelo mesmo, diferentemente do nosso estudo, foi utilizado ração-padrão nesses testes comportamentais, mas não alimento palatável. Frente a similaridade entre adição de drogas e consumo de alimento palatável (47), é possível que a ausência de aumento na atividade da butirilcolinesterase no soro de ratas manipuladas no período neonatal, após exposição crônica ao chocolate, esteja relacionada com a reincidência (*reinstatement*) da preferência pelo chocolate identificada nesse grupo de animais após 7 dias de abstinência do alimento palatável.

Embora o consumo de chocolate não tenha afetado a atividade da acetilcolinesterase cerebral, a privação desse tipo de alimento diminuiu a atividade da enzima em ambos os grupos de ratas manipuladas e não-manipuladas no período neonatal. Vale a pena ressaltar que o uso de inibidores da enzima AChE (acetilcolinesterase) foi relatado por apresentar propriedades anti-abstinência em um modelo animal de dependência a morfina (48) e por atenuar a auto-administração de baixas doses de cocaína bem como a busca por alimentos (49). Dessa forma, é possível que a atividade reduzida da acetilcolinesterase cerebral, detectada após a privação de chocolate, seja uma estratégia para lidar com a ausência do alimento palatável ou, ainda, uma reação natural à retirada do alimento preferido. Estudos experimentais prévios relatam que a atividade da AChE (acetilcolinesterase) em culturas de células cerebrais varia de acordo com a exposição do plasma ao estado alimentado ou de jejum em animais (50), sugerindo que um fator relacionado ao consumo de alimento pode desempenhar um papel relevante em nossos achados.

Considerando a acetilcolina (substrato das colinesterases) algumas evidências demonstram aumentos nos níveis de acetilcolina central após o consumo de alimento (51, 52). Adicionalmente, os níveis de acetilcolina cerebrais podem ser afetados também pelo ganho de peso corporal (52). Um relato de caso recente descreve uma mulher com anorexia nervosa

apresentando uma forma clínica da síndrome miogênica mimetizando miastenia grave, que foi completamente revertida pelo consumo de chocolate (53). Embora os mecanismos envolvidos não sejam claros, é possível que a acetilcolina esteja envolvida nesse achado.

Em conclusão, animais manipulados no período neonatal são capazes de recuperar sua preferência pelo alimento palável após um curto período de abstinência e isso é acompanhado por uma manutenção no padrão de atividade da enzima butirilcolinesterase no soro. Esses animais também apresentam maior perda de peso corporal, porém acumulam gordura abdominal de forma não tão persistentemente quanto os animais não-manipulados. Supondo que tais achados utilizando esse modelo animal pudessem ser transportados para humanos, permitiria-se propor que eventos precoces na vida afetariam potencialmente o comportamento alimentar de forma persistente (54). Por outro lado, as condições neonatais também influenciam a suscetibilidade aos efeitos prejudiciais de ser cronicamente exposto ao alimento palatável ou à sua abstinência. Em uma era de elevada prevalência de obesidade e de fácil disponibilidade de alimentos palatáveis, o conhecimento de que experiências precoces podem determinar a vulnerabilidade de um indivíduo e sua resistência a desafios nutricionais na vida adulta, poderia contribuir para propor visões futuras nas áreas de prevenção e terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. Lesage, J.; Blondeau, B.; Grino, M.; Breant, B.; Dupouy, J.P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*. 2001, 142:1692-1702.

2. O'Regan, D.; Kenyon, C.J.; Seckl, J.R.; Holmes, M.C. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004, 287:E863-870.
3. Barker, D.J. In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci. (Lond)*. 1998, 95:115-128.
4. Seckl, J.R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol.* 2004, 151 Suppl 3:U49-62.
5. Jones, A.; Godfrey, K.M.; Word, P.; Osmond, C.; Gouliden, P.; Phillips, D.I. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 91:1868-1871.
6. Tsigos, C.; Chrousos, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 2002, 53:865-871.
7. Liu, D.; Diorio, J.; Tannenbaum, B.; Caldji, C.; Francis, D.; Freedman, A.; Sharma, S.; Pearson, D.; Plotsky, P.M.; Meaney, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997, 277:1659-1662.
8. Branchi, I.; Santucci, D.; Alleva, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav. Brain. Res.* 2001, 125:49-56.
9. Pryce, C.R.; Bettschen, D.; Feldon, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev. Psychobiol.* 2001, 38:239-251.
10. Levine, S.; Haltmeyer, G.C.; Karas, G.G.; Denenberg, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol. Behav.* 1967, 2:55-59.

11. Padoin, M.J.; Cadore, L.P.; Gomes, C.M.; Barros, H.M.; Lucion, A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav. Neurosci.* 2001, 115:1332-1340.
12. Panagiotaropoulos, T.; Papaioannou, A.; Pondiki, S.; Prokopiou, A.; Stylianopoulou, F.; Gerozissis, K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology.* 2004, 79:109-118.
13. Meaney, M.J.; Aitken, D.H.; Sharma, S.; Viau, V.; Sarrieau, A. Postnatal handling increases hippocampal type II glucocorticoid receptors and enhances adrenocorticoid negative feedback efficacy in the rat. *Neuroendocrinology.* 1989, 50:597–604.
14. Ladd, C.O.; Thirvikraman, K.V.; Huot, R.L.; Plotsky, P.M. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology.* 2005, 30:520-533.
15. Silveira, P.P.; Portella, A.K.; Clemente, Z.; Bassani, E.; Tabajara, A.S.; Gamaro, G.D.; Dantas, G.; Torres, I.L.; Lucion, A.B.; Dalmaz, C. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav.* 2004, 80:739-745.
16. Silveira, P.P.; da Silva Benetti, C.; Ayres, C.; Pederiva, F.Q.; Portella, A.K.; Lucion, A.B.; Dalmaz, C. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav. Brain. Res.* 2006, 173:205-210.
17. da S Benetti, C.; Silveira, P.P.; Portella, A.K.; Diehl, L.A.; Nunes, E.; de Oliveira, V.S.; Dalmaz, C.; Goldani, M.Z. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr. Res.* 2007, 62:405-411.

18. da S Benetti, C.; Silveira, P.P.; Matté, C.; Stefanello, F.M.; Leite, M.C.; Gonçalves, C.A.; Wyse, A.T.; Dalmaz, C.; Goldani, M.Z. Effects of a chronic exposure to a highly palatable diet and its withdrawal, in adulthood, on cerebral Na⁺,K⁺-ATPase and plasma S100B in neonatally handled rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2010, 28:153-159.
19. Mack, A.; Robitzki, A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol.* 2000, 60:607-628.
20. Alcantara, V.M.; Chautard-Freire-Maia, E.A.; Scartezini, M.; Cerci, M.S.; Braun-Prado, K.; Picheth, G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2002, 62:399-404.
21. Calderon-Margalit, R.; Adler, B.; Abramson, J.H.; Gofin, J.; Kark, J.D. Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Clin. Chem.* 2006, 52:845-852.
22. Valle, A.; O'Connor, D.T.; Taylor, P.; Zhu, G.; Montgomery, G.W.; Slagboom, P.E.; Martin, N.G.; Whitfield, J.B. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clin. Chem.* 2006, 52:1014-1020.
23. Iwasaki, T.; Yoneda, M.; Nakajima, A.; Terauchi, Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern. Med.* 2007, 46:1633-1639.
24. Muacević-Kataneca, D.; Bradamante, V.; Reinec, Z.; Sucić, M.; Poljicanin, T.; Busljeta, I.; Metelko, Z. Clinical study on the effect of simvastatin on butyrylcholinesterase activity. *Arzneimittelforschung.* 2005, 55:271-275.

25. Lucić Vrdoljak, A.; Bradamante, V.; Radić, B.; Peraica, M.; Fuchs, R.; Reiner, Z. Butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in dexamethasone treated rats. *Acta Pharm.* 2005, 55:177-185.
26. Kálmán, J.; Juhász, A.; Rakonczay, Z.; Abrahám, G.; Zana, M.; Boda, K.; Farkas, T.; Penke, B.; Janka, Z. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. *Life Sci.* 2004, 75:1195-1204.
27. Rustemeijer, C.; Schouten, J.A.; Voerman, H.J.; Beynen, A.C.; Donker, A.J.; Heine, R.J. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? *Clin. Sci. (Lond).* 2001, 101:29-35.
28. Bradamante, V.; Krnić, Z.; Zrinski, R.; Konjevoda, P.; Reiner, Z. Changes in butyrylcholinesterase activity and serum lipids after oxprenolol and glibenclamide treatments in non-diabetic rats. *Arzneimittelforschung.* 2006, 56:64-69.
29. Servatius, R.J.; Ottenweller, J.E.; Guo, W.; Beldowicz, D.; Zhu, G.; Natelson, B.H. Effects of inescapable stress and treatment with pyridostigmine bromide on plasma butyrylcholinesterase and the acoustic startle response in rats. *Physiol. Behav.* 2000, 69:239-246.
30. Weber, U.; Brank, M.; Grubic, Z. Glucocorticoids differentially control synthesis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat liver and brain. *Chem. Biol. Interact.* 1999, 119-120:341-347.
31. Verjee, Z.H.; Behal, R.; Ayim, E.M. Effect of glucocorticoids on liver and blood cholinesterases. *Clin. Chim. Acta.* 1977, 81:41-46.
32. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72:248-254.

33. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.J.R.; Feather-Stone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7:88-95.
34. Teegarden, S.L.; Bale, T.L. Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. *Physiol. Behav.* 2008, 93:713-723.
35. Dallman, M.F.; Warne, J.P.; Foster, M.T.; Pecoraro, N.C. Glucocorticoids and insulin both modulate caloric intake through actions on the brain. *J. Physiol.* 2007, 583:431-436.
36. Boggiano, M.M.; Artiga, A.I.; Pritchett, C.E.; Chandler-Laney, P.C.; Smith, M.L.; Eldridge, A.J. High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: an animal model of lean vs obese binge-eating and obesity with and without binge-eating. *Int. J. Obes. (Lond).* 2007, 31:1357-1367.
37. Armitage, G.; Hervey, G.R.; Rolls, B.J.; Rowe, E.A.; Tobin, G. The effects of supplementation of the diet with highly palatable foods upon energy balance in the rat. *J. Physiol.* 1983, 342:229-251.
38. Iwasaki, S.; Inoue, K.; Kiriike, N.; Hikiji, K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol. Behav.* 2000, 70:551-556.
39. Galietta, G.; Loizzo, A.; Loizzo, S.; Trombetta, G.; Spampinato, S.; Campana, G.; Capasso, A.; Palermo, M.; Guarino, I.; Franconi, F. Administration of antisense oligonucleotide against pro-opiomelanocortin prevents enduring hormonal alterations induced by neonatal handling in male mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 550:180-185.

40. Svensson, A.M.; Hellerström, C.; Jansson, L. Diet-induced obesity and pancreatic islet blood flow in the rat: a preferential increase in islet blood perfusion persists after withdrawal of the diet and normalization of body weight. *J. Endocrinol.* 1996, 151:507-511.
41. Diniz, Y.S.; Fernandes, A.A.; Campos, K.E.; Mani, F.; Ribas, B.O.; Novelli, E.L. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food. Chem. Toxicol.* 2004, 42:313-319.
42. Matsuzawa, N.; Takamura, T.; Kurita, S.; Misu, H.; Ota, T.; Ando, H.; Yokoyama, M.; Honda, M.; Zen, Y.; Nakanuma, Y.; Miyamoto, K.; Kaneko, S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* 2007, 46:1392-1403.
43. Archer, Z.A.; Rayner, D.V.; Duncan, J.S.; Bell, L.M.; Mercer, J.G. Introduction of a high-energy diet acutely up-regulates hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript, Mc4R and brown adipose tissue uncoupling protein-1 gene expression in male Sprague-Dawley rats. *J. Neuroendocrinol.* 2005, 17:10-17.
44. Yoshida, T.; Hayashi, M.; Monkawa, T.; Saruta, T. Regulation of obese mRNA expression by hormonal factors in primary cultures of rat adipocytes. *Eur. J. Endocrinol.* 1996, 135:619-625.
45. Akiyama, T.; Tachibana, I.; Shirohara, H.; Watanabe, N.; Otsuki, M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1996, 31:27-35.
46. Naderali, E.K.; Fatani, S.; Williams, G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. *Atherosclerosis.* 2004, 172:63-69.

47. Randell, E.W.; Mathews, M.S.; Zhang, H.; Seraj, J.S.; Sun, G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin. Biochem.* 2005, 38:799-805.
48. Brimijoin, S.; Gao, Y.; Anker, J.J.; Gliddon, L.A.; Lafleur, D.; Shah, R.; Zhao, Q.; Singh, M.; Carroll, M.E. A cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase selectively blocks cocaine toxicity and reinstatement of drug seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2008, [Epub ahead of print].
49. Avena, N.M.; Rada, P.; Hoebel, B.G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008, 32:20-39.
50. Buccafusco, J.J.; Zhang, L.C.; Shuster, L.C.; Jonnala, R.R.; Gattu, M. Prevention of precipitated withdrawal symptoms by activating central cholinergic systems during a dependence-producing schedule of morphine in rats. *Brain. Res.* 2000, 852:76-83.
51. Grasing, K.; He, S.; Yang, Y. Dose-related effects of the acetylcholinesterase inhibitor tacrine on cocaine and food self-administration in rats. *Psychopharmacology. (Berl)*. 2008, 196:133-142.
52. Shambaugh, G.E. 3rd; Koehler, R.R.; Radosevich, J.A. Nutrition and fetal brain maturation. II. Impact of maternal starvation on changing levels of acetylcholinesterase and enolase in vitro. *Exp. Cell. Res.* 1988, 175:344-353.

LEGENDAS PARA AS FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo do programa de tratamentos: DPN, dia pós-natal, DP, dieta palatável (chocolate).

Figura 2: Consumo crônico de ração-padrão e chocolate em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas nos primeiros dias de vida. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. (A) Média do consumo de ração-padrão. (B) Média do consumo de chocolate. \square NM_ração; \blacksquare NM_chocolate; \square M_ração; \blacktriangle M_chocolate. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito da dieta e uma interação entre tempo x diet ($P < 0,01$). $N = 3-4$ caixas/grupo. \square não-manipulado; \blacksquare manipulado.

Figura 3: Comportamento alimentar, expresso em média \pm E.P.M de chocolate consumido por rata durante a exposição aguda a esse tipo de alimento após 7 dias de privação de chocolate. $N = 13-16$ ratas/grupo. Ratas fêmeas manipuladas consumiram mais chocolate durante esse curto período de exposição em comparação com ratas não-manipuladas no período neonatal (Teste t de *student*, $P = 0,011$).

Figura 4: Ganho de peso corporal durante a exposição crônica e a abstinência de chocolate em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M de ganho de peso corporal durante a exposição a longo prazo ao chocolate. $N = 10-16$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou o ganho de peso corporal (ANOVA de duas vias, $P = 0,001$). (B) Média \pm E.P.M de ganho/perda de peso corporal após as primeiras 24h de abstinência de chocolate. $N = 13-16$ ratas/grupo. Ratas manipuladas período neonatal exibiram uma redução mais evidente do peso corporal (Teste t de *student*, $P < 0,001$). (C) Média \pm E.P.M de ganho de

peso corporal após o período de 30 dias de abstinência de chocolate. $N= 13-16$ ratas/grupo. O ganho de peso não diferiu entre os grupos (Teste t de *student*, $P>0,050$).

Figura 5: Depósito de gordura abdominal após a exposição crônica ao chocolate e a abstinência desse tipo de alimento em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M da razão gordura abdominal/peso corporal após a exposição crônica ao chocolate. $N= 9-12$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou o depósito de gordura abdominal (ANOVA de duas vias, $P<0,001$). Foi observada uma interação entre grupo x dieta ($P=0,028$). * Significativamente diferente de todos os outros grupos (Teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M da razão gordura abdominal/peso corporal após a abstinência de chocolate. $N= 6-15$ ratas/grupo. Após o período de privação de chocolate, o depósito de gordura abdominal permaneceu aumentado nas ratas não-manipuladas que receberam esse alimento palatável (ANOVA de duas vias, interação entre grupo x dieta, $P=0,016$). * Significativamente diferente do grupo manipulado (Teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$).

Figura 6: Níveis de triglicerídios no plasma após a exposição crônica ao chocolate e a abstinência desse tipo de alimento. (A) Média \pm E.P.M dos níveis de triglicerídios no plasma após exposição crônica ao chocolate. $N= 7-11$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou os níveis de triglicerídios (ANOVA de duas vias, $P=0,019$). (B) Média \pm E.P.M dos níveis de triglicerídios no plasma após o período de abstinência de chocolate. $N= 12-16$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, as ratas exibiram uma redução nos níveis plasmáticos de triglicerídios (ANOVA de duas vias, $P=0,018$).

Figura 7: Atividade da colinesterase no soro após exposição crônica e abstinência de chocolate. (A) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase no soro após exposição crônica ao chocolate. $N= 5-6$ ratas/grupo. O consumo de chocolate induziu um aumento na atividade da colinesterase no soro de ratas não-manipuladas (interação entre grupo x dieta, ANOVA de duas vias, $P=0,028$). (B) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase no soro após o período de privação de chocolate. $N= 6$ ratas/grupo. Após 30 dias de abstinência de chocolate, essa atividade não diferiu entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

* Significativamente diferente de todos os outros grupos (Teste post-hoc de Duncan, $P=0,05$).

Figura 8: Atividade da colinesterase cerebral após exposição crônica e abstinência de chocolate. (A) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase cerebral após exposição crônica ao chocolate. $N= 5-7$ ratas/grupo. Durante o consumo de chocolate, a atividade da colinesterase cerebral não diferiu entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$). (B) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase cerebral após o período de privação de chocolate. $N= 5$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, a atividade da enzima diminuiu nos grupos de ratas manipuladas e não-manipuladas no período neonatal (ANOVA de duas vias, $P=0,011$).

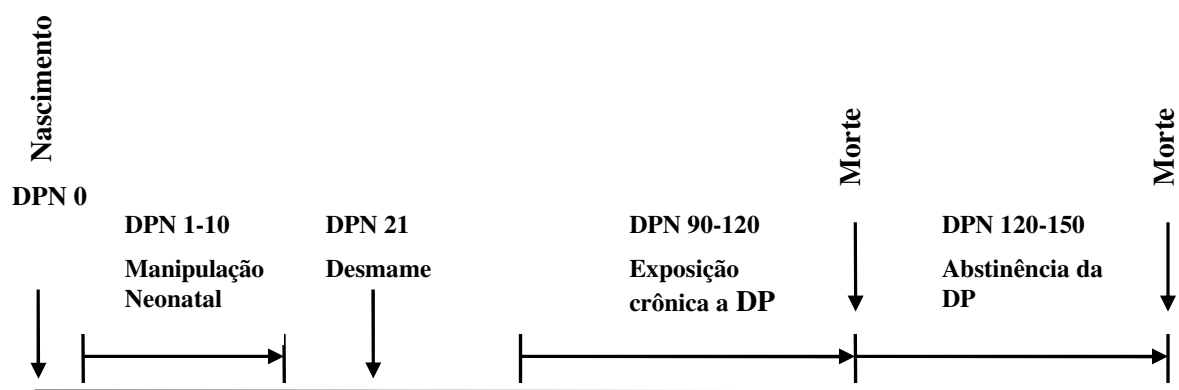


Figura 1: Linha do tempo do programa de tratamentos: DPN, dia pós-natal, DP, dieta palatável (chocolate).

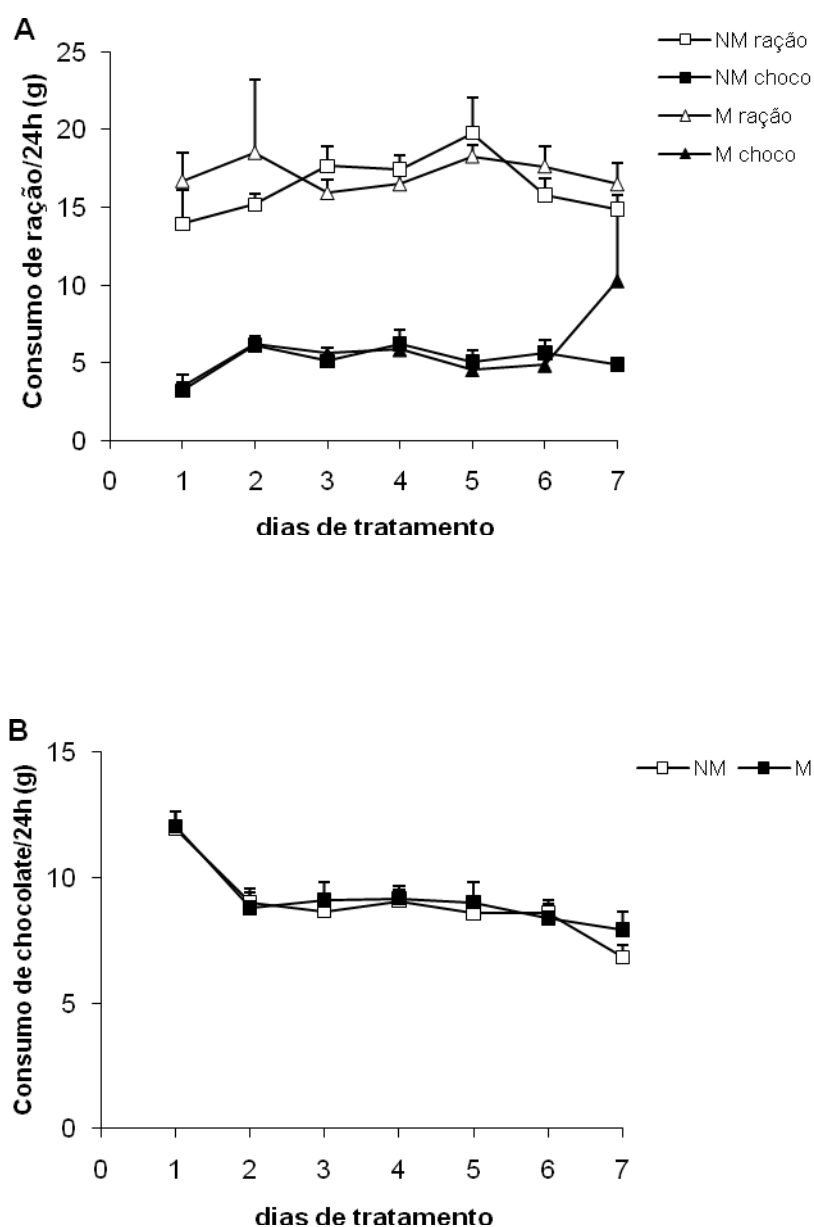


Figura 2: Consumo crônico de ração-padrão e chocolate em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas nos primeiros dias de vida. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. (A) Média do consumo de ração-padrão. (B) Média do consumo de chocolate. \square NM_ração; \blacksquare NM_chocolate; \square M_ração; \blacktriangle M_chocolate. ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito da dieta e uma interação entre tempo x diet ($P < 0,01$). $N = 3-4$ caixas/grupo. \square não-manipulado; \blacksquare manipulado.

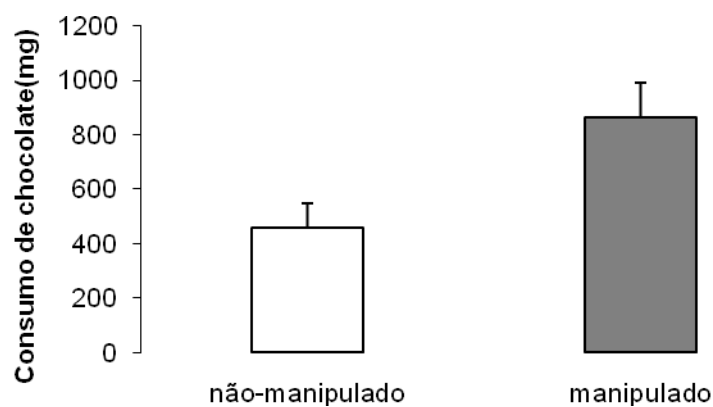


Figura 3: Comportamento alimentar, expresso em média \pm E.P.M de chocolate consumido por rata durante a exposição aguda a esse tipo de alimento após 7 dias de privação de chocolate. $N= 13-16$ ratas/grupo. Ratas fêmeas manipuladas consumiram mais chocolate durante esse curto período de exposição em comparação com ratas não-manipuladas no período neonatal (Teste t de *student*, $P=0,011$).

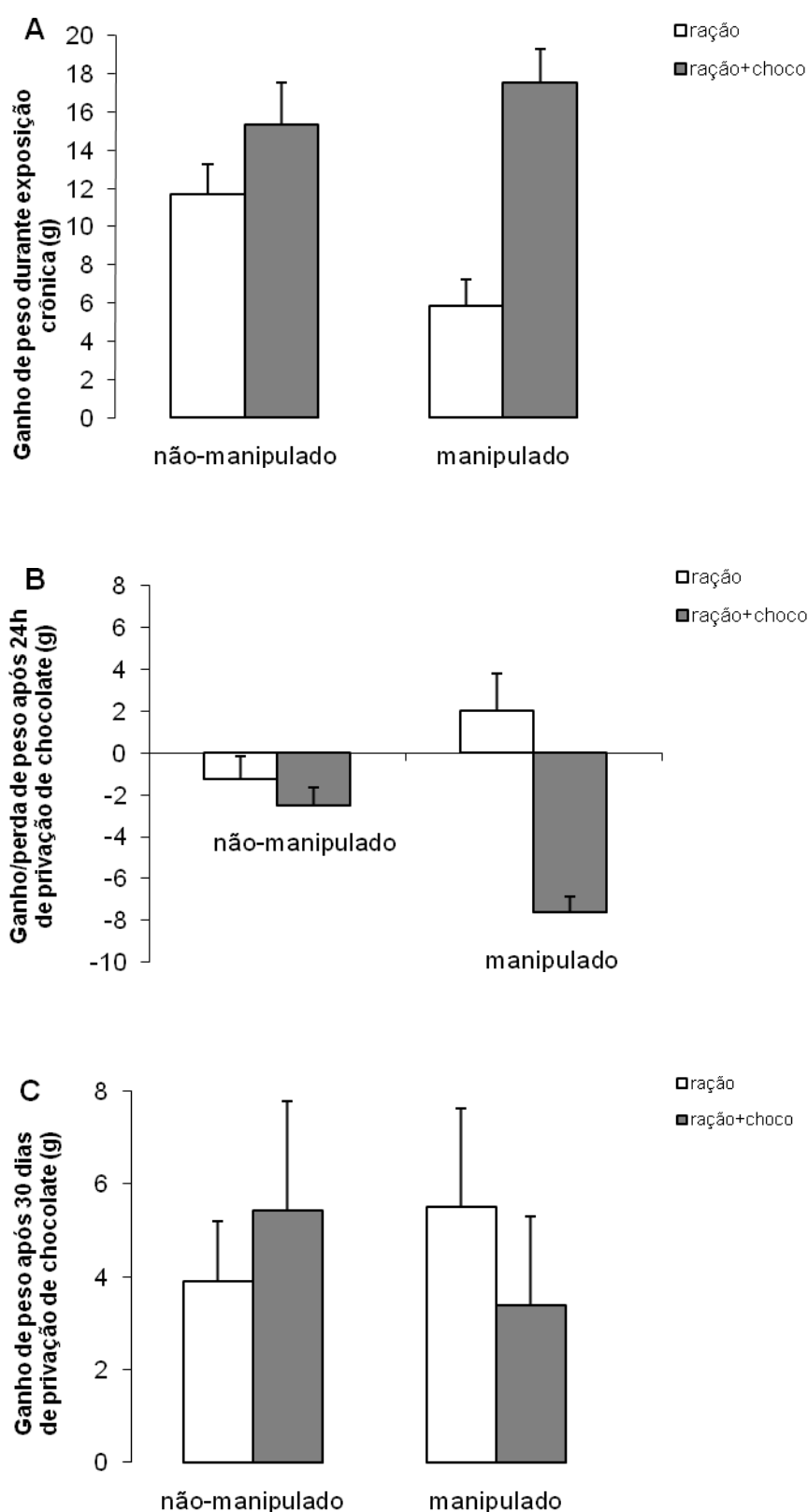


Figura 4: Ganho de peso corporal durante a exposição crônica e a abstinência de chocolate em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M de ganho de

peso corporal durante a exposição a longo prazo ao chocolate. $N= 10-16$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou o ganho de peso corporal (ANOVA de duas vias, $P=0,001$).

(B) Média \pm E.P.M de ganho/perda de peso corporal após as primeiras 24h de abstinência de chocolate. $N= 13-16$ ratas/grupo. Ratas manipuladas período neonatal exibiram uma redução mais evidente do peso corporal (Teste t de *student*, $P<0,001$).

(C) Média \pm E.P.M de ganho de peso corporal após o período de 30 dias de abstinência de chocolate. $N= 13-16$ ratas/grupo. O ganho de peso não diferiu entre os grupos (Teste t de *student*, $P>0,050$).

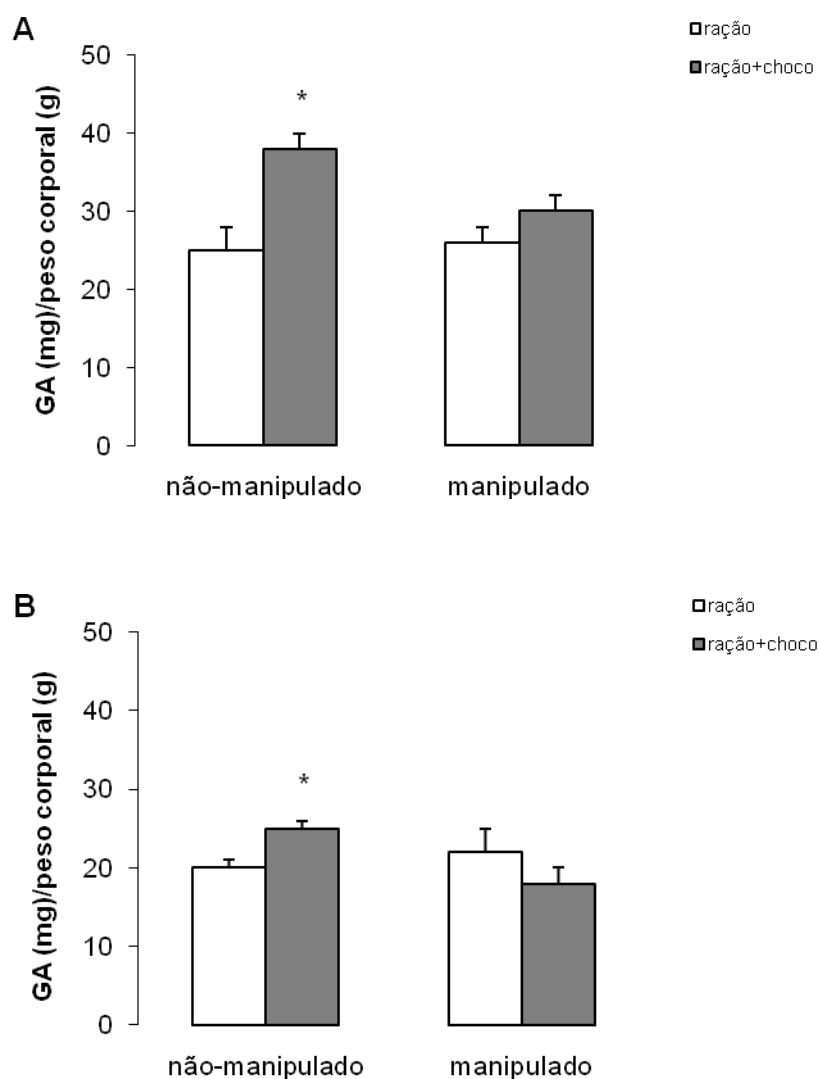


Figura 5: Depósito de gordura abdominal após a exposição crônica ao chocolate e a abstinência desse tipo de alimento em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M da razão gordura abdominal/peso corporal após a exposição crônica ao chocolate. $N= 9-12$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou o depósito de gordura abdominal (ANOVA de duas vias, $P<0,001$). Foi observada uma interação entre grupo x dieta ($P=0,028$). * Significativamente diferente de todos os outros grupos (Teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M da razão gordura abdominal/peso corporal após a abstinência de chocolate. $N= 6-15$ ratas/grupo. Após o período de privação de chocolate, o depósito de gordura abdominal permaneceu aumentado nas ratas não-manipuladas que receberam esse alimento palatável (ANOVA de duas vias, interação entre grupo x dieta,

$P=0,016$). * Significativamente diferente do grupo manipulado (Teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$).

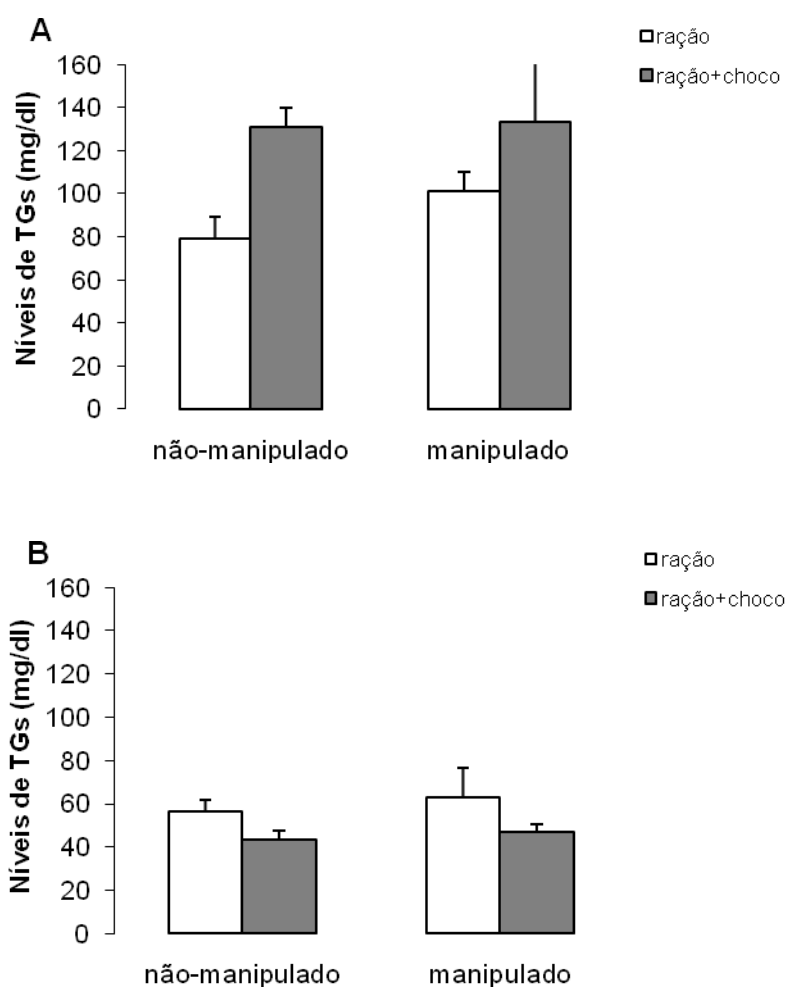


Figura 6: Níveis de triglicerídios no plasma após a exposição crônica ao chocolate e a abstinência desse tipo de alimento. (A) Média \pm E.P.M dos níveis de triglicerídios no plasma após exposição crônica ao chocolate. $N= 7-11$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou os níveis de triglicerídios (ANOVA de duas vias, $P=0,019$). (B) Média \pm E.P.M dos níveis de triglicerídios no plasma após o período de abstinência de chocolate. $N= 12-16$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, as ratas exibiram uma redução nos níveis plasmáticos de triglicerídios (ANOVA de duas vias, $P=0,018$).

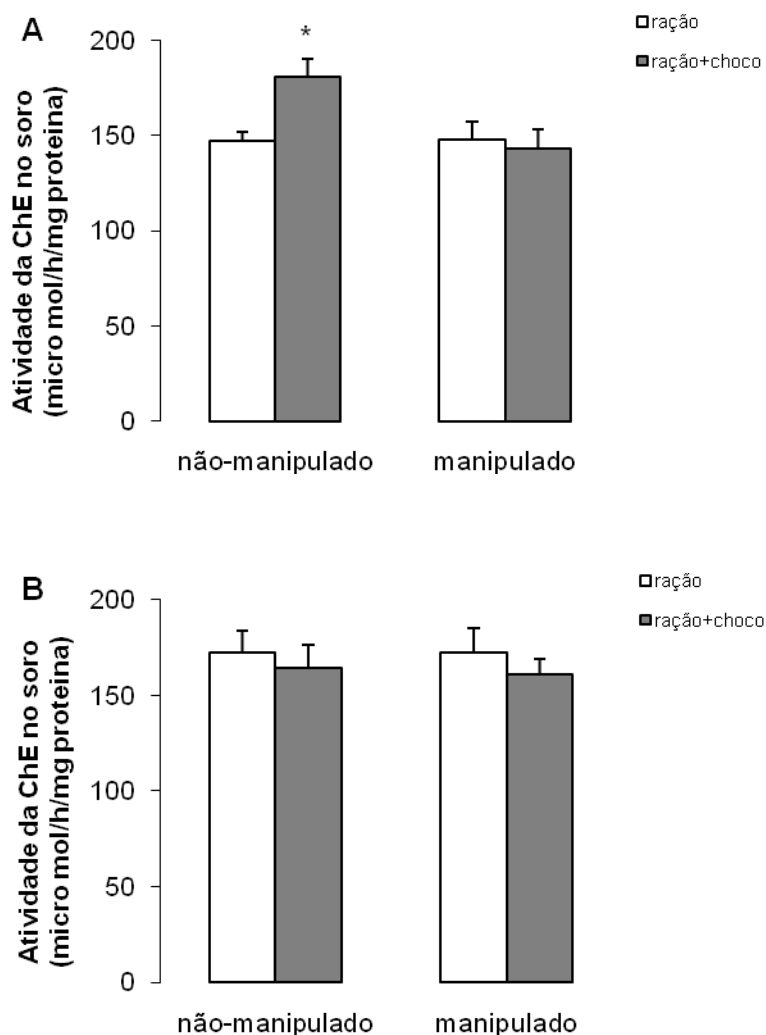


Figura 7: Atividade da colinesterase no soro após exposição crônica e abstinência de chocolate. (A) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase no soro após exposição crônica ao chocolate. $N= 5-6$ ratas/grupo. O consumo de chocolate induziu um aumento na atividade da colinesterase no soro de ratas não-manipuladas (interação entre grupo x dieta, ANOVA de duas vias, $P=0,028$). (B) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase no soro após o período de privação de chocolate. $N= 6$ ratas/grupo. Após 30 dias de abstinência de chocolate, essa atividade não diferiu entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

* Significativamente diferente de todos os outros grupos (Teste post-hoc de Duncan, $P=0,05$).

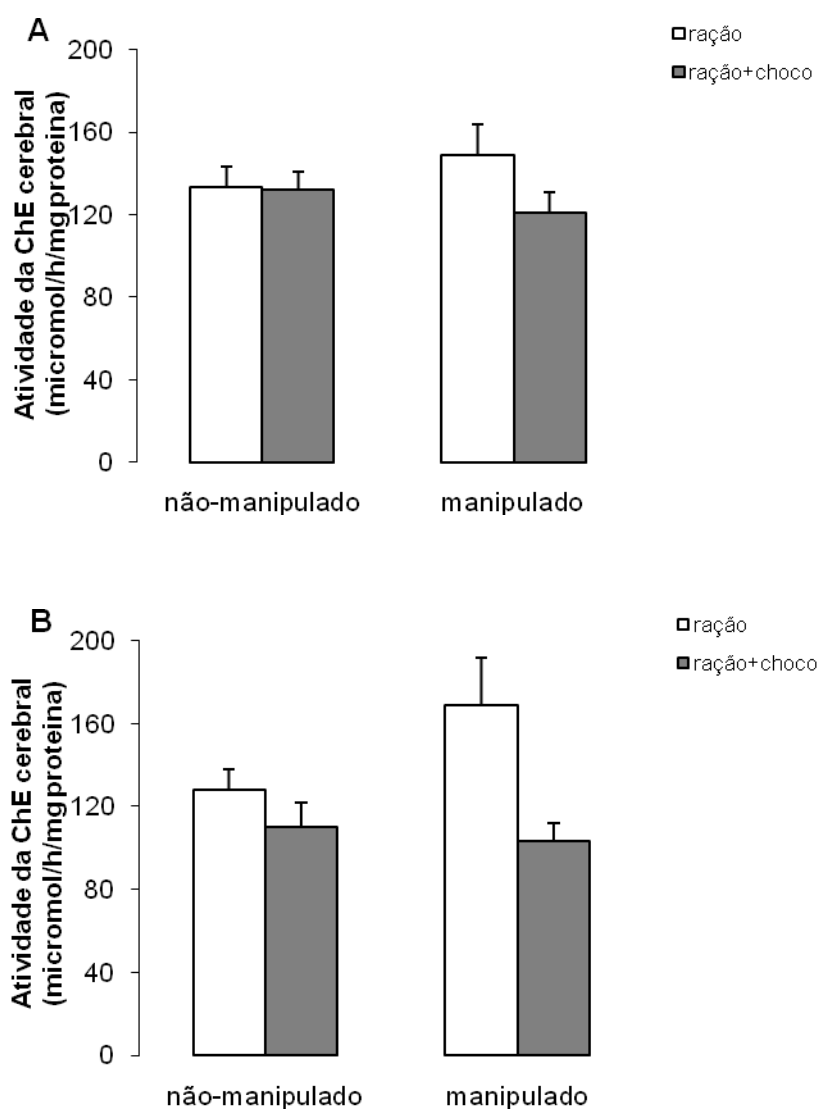


Figura 8: Atividade da colinesterase cerebral após exposição crônica e abstinência de chocolate. (A) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase cerebral após exposição crônica ao chocolate. $N= 5-7$ ratas/grupo. Durante o consumo de chocolate, a atividade da colinesterase cerebral não diferiu entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$). (B) Média \pm E.P.M da atividade da colinesterase cerebral após o período de privação de chocolate. $N= 5$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, a atividade da enzima diminuiu nos grupos de ratas manipuladas e não-manipuladas no período neonatal (ANOVA de duas vias, $P=0,011$).

Tabela 1. Preferência pelo chocolate durante o período de 30 dias de exposição à dieta palatável em ratas manipuladas e não-manipuladas nos primeiros dias de vida.

Grupo	Dia 1	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Dia 24	Dia 30
NM	0,88±0,02	0,75±0,04	0,72±0,05	0,74±0,02	0,72±0,02	0,70±0,01
M	0,85±0,01	0,75±0,03	0,74±0,04	0,74±0,02	0,73±0,02	0,70±0,04

Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média. $N = 4-5$ caixas/grupo. A preferência pelo chocolate diminuiu com o passar do tempo de exposição (ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $P=0,001$, $n= 4-5$ caixas/grupo). NM= não-manipulado, M= manipulado.

7.2 SEÇÃO II – ARTIGO 2

Estudo dos efeitos da manipulação neonatal sobre a resposta metabólica e neuroquímica, bem como sobre o comportamento de ratas adultas expostas cronicamente à dieta palatável e privadas desse tipo dieta.

Artigo 2: da Silva Benetti C; Silveira PP; Matté C; Stefanello FM; Leite MC; Gonçalves CA; Wyse AT; Dalmaz C; Goldani MZ. *Effects of a chronic exposure to a highly palatable diet and its withdrawal, in adulthood, on cerebral Na^+,K^+ -ATPase and plasma S100B in neonatally handled rats.* Publicado: *Int J Dev Neurosci.* 2010;28(2):153-9.

Title: Effects of a chronic exposure to a highly palatable diet and its withdrawal, in adulthood, on cerebral Na⁺,K⁺-ATPase and plasma S100B in neonatally handled rats.

Running Title: Neonatal handling, chronic highly palatable diet, withdrawal and metabolism.

List of authors: Carla da S. Benetti*^{1,4}; Patrícia P. Silveira^{1,4}; Cristiane Matté³; Francieli M. Stefanello³; Marina C. Leite³; Carlos Alberto S. Gonçalves^{2,3}; Angela T. S. Wyse³; Carla Dalmaz^{2,3}; Marcelo Z. Goldani^{1,4}.

¹PPG Saúde da Criança e do Adolescente, FAMED, UFRGS (postal code: 90035-003), ²PPG Neurociências, ICBS, UFRGS (90046-900), ³Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS (90035-003) e ⁴Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS (90035-903). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Mailing address: Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco

90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Fone: 051- 3359-8515

Fax: 051- 3359-8001

Email: mgoldani@hcpa.ufrgs.br (Goldani, MZ).

Financial Support: CNPq, Capes and FINEP/Rede IBNnet.

ABSTRACT

We have previously demonstrated that early environment influences the metabolic response, affecting abdominal fat deposition in adult female rats exposed to a long-term highly caloric diet. In the present study, our goal was to verify the effects of the chronic exposure, in adulthood, to a highly palatable diet (chocolate) on cerebral Na^+, K^+ -ATPase activity and S100B protein concentrations, and the response to its withdrawal in neonatally handled and non-handled rats. We measured the consumption of foods (standard lab chow and chocolate), body weight gain, S100B protein concentrations, as well as cerebral Na^+, K^+ -ATPase activity during chronic exposure and after chocolate withdrawal in adult female rats that had been exposed or not to neonatal handling (10 min/day, 10 first days of life). Non-handled rats chronically exposed to chocolate exhibited increased plasma S100B levels, but there was no difference in abdominal fat S100B concentration between groups. Chronic chocolate consumption decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in both amygdala and hippocampus in non-handled, but not in handled rats, and this effect disappeared after chocolate withdrawal. Non-handled animals also demonstrated increased frequency of head shaking in the open field after 24 hours of chocolate withdrawal in comparison to handled ones. These findings suggest that neonatal handling modifies the vulnerability to metabolic and brain alterations induced by chronic exposure to a highly palatable diet in adulthood.

Key words: neonatal stress, neonatal handling, feeding behavior, highly palatable food, abdominal fat, S100B levels, Na^+, K^+ -ATPase activity, withdrawal.

Abbreviations: HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

INTRODUCTION

Neonatal handling is proposed as an experimental model to evaluate the effects of early environment on several outcomes in adulthood. This protocol is characterized by a brief, repeated and apparently innocuous separation from the mother in the neonatal period, and is associated with increased maternal care (Liu et al., 1997; Branchi et al., 2001; Pryce et al., 2001). It is well established that neonatally handled rats exhibit in adulthood decreased stress response (Levine et al., 1967; Padoin et al., 2001; Panagiotaropoulos et al., 2004) facing both acute (Meaney et al., 1989) and chronic stress situations (Panagiotaropoulos et al., 2004; Ladd et al., 2005).

In addition, neonatally handled rats exhibit increased consumption of palatable foods during acute exposure to this type of food (Silveira et al., 2006; da Silva Benetti et al., 2007). In our previous studies, we described a protective influence of neonatal handling on abdominal fat deposition (da Silva Benetti et al., 2007) in female rats after a chronic exposure to a highly palatable, highly caloric diet. Therefore, it was suggested that a specific metabolic response to chronic highly caloric diets could protect handled females from the harmful effects of this environmental challenge in adulthood.

Na^+, K^+ -ATPase is an essential enzyme responsible for generating and maintaining the membrane potential necessary for neural excitability. Metabolic diseases, such as obesity and diabetes, have been demonstrated to induce a decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity (Iannello et al., 2007). On the other hand, S100B is a calcium-binding protein, predominantly expressed by astrocytes in vertebrate brain (Marenholz et al., 2004), although some evidence has suggested its production in other non-cerebral tissues, such as adipocytes (Steiner et al., 2007). Increased serum S100B levels have been shown after exposure to stress in rats (Scaccianoce et al., 2004; Diehl et al., 2007) and humans (Schulpis et al., 2006). Serum

S100B is influenced by diet and by body weight gain (Holtkamp et al., 2008). In humans and animals studies, myocardial ischemia increases serum S100B (Pfeifer et al., 2008; Mazzini et al., 2005).

In our previous findings, neonatal handling attenuated the increase in abdominal fat accumulation, as well as in triglycerides levels, after chronic exposure to a highly palatable diet in adulthood (da Silva Benetti et al., 2007). Therefore, the present study used a protocol of chronic exposure to a highly palatable, highly caloric diet (chocolate) and withdrawal of this diet to better understand how early life handling affects the metabolic response. Then, in an attempt to understand possible mechanisms involved in these findings, Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined in hippocampus and amygdala, two brain structures classically described to be involved in the regulation of feeding behavior (Clifton et al., 1998; Giraudo et al., 1998). Moreover, serum S100B was also measured both during the chronic highly palatable diet and thereafter. We hypothesized that neonatally handled animals are less vulnerable to the metabolic effects of a chronic highly palatable diet exposure, as well as to its withdrawal.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subjects:

Pregnant Wistar rats bred at our animal facility were randomly selected. Animals were single-housed in home cages made of Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust and maintained in a controlled environment: standard dark/light cycle (lights on between 07:00 h and 19:00 h), temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cage cleaning once a week, food and water provided *ad libitum*. All litters were culled within 24 h of birth to eight pups and

maintained intact except for handling procedures, which were carried out between 09:00h and 11:00h. The researcher changed gloves between manipulations of each litter to avoid the spread of any kind of odor from nest to nest.

The day of birth was considered as day 0. Litters were weaned and separated by sex on postnatal day 21. Two female pups were used per litter per group of the 4 groups (see below). After weaning, rats were housed four to five per cage, and maintained undisturbed in a controlled environment (as described above) until starting the exposure to highly palatable food (day 60). Forty-eight female rats were used in the different experiments, derived from 15 different litters. All animal procedures were approved by the Institutional Ethical Committee (Ethical Committee, UFRGS).

Neonatal Handling model:

Non-handled group: Pups were left undisturbed with the dam until weaning. Routine cage cleaning was suspended during this period.

Handled group: This procedure was carried out as described previously (da Silva Benetti et al., 2007). The dam was gently pulled to one side of the cage and the pups were removed from their home cage and placed into a clean cage lined with clean paper towels. The litter was then placed in an incubator set to maintain an ambient temperature of 30-32°C. After 10 minutes, pups were returned to their dams. The whole litter was handled altogether (males and females), however after weaning males were used in a different project. This procedure was performed from day 1 to 10 following birth, and pups were then left undisturbed until postnatal day 21.

Exposure to highly palatable diet:

Starting on day 60 of life, female rats were habituated to the new food. Animals were placed individually in a lightened rectangular box (40 x 15 x 20 cm) with floor and side walls made of wood and a glass ceiling. A previously weighed amount of chocolate (milk chocolate ® – Neugebauer) was offered during 3 min each day, for 5 days, under food restriction (receiving about 80% of habitual ingestion). On the 6th day, rats were tested for the consumption of palatable food, having received lab chow *ad libitum* for the previous 24 hours. These procedures were performed to verify whether the animals would eat chocolate as they usually ingest other types of palatable food (Silveira et al., 2004), both with and without food restriction. After this habituation period, the animals received rat chow *ad libitum*. On the 83rd day of life all animals were weighed and randomized to different groups that were housed in 3 to 4 per cage. The groups were subdivided into 1) Non-handled + standard lab chow, 2) Non-handled + chocolate + standard lab chow, 3) Handled + standard lab chow and 4) Handled + chocolate + standard lab chow. One week later, specific groups started to receive chocolate *ad libitum* in the homecage. During 30 days, previously weighed amounts of chocolate and standard lab chow were offered, and the remaining amount was measured each day to evaluate the consumption. Food consumption was measured per cage and then divided by the number of animals per cage to determine mean consumption per animal. A group of animals was then sacrificed by decapitation after 6 hours of fasting (which was imposed to the animals during the first six hours of the light cycle). Detailed standard lab chow and chocolate consumption, as well as body weight gain data have already been published (da Silva Benetti et al., 2007), and were reproduced in this subset of animals.

Highly palatable diet withdrawal:

After chronic exposure to chocolate, a subset of the specific groups of female rats were deprived of chocolate for 30 days, receiving only standard lab chow and water *ad libitum*.

Response to highly palatable diet withdrawal – Open Field:

After the first 24 hours of chocolate withdrawal, the animals were evaluated to spontaneous signs of withdrawal of the highly palatable food. They were placed individually in a 50-centimeter high, 40 cm x 60 cm open wooden arena with a frontal glass wall. The floor was equally divided with white lines into 12 rectangles measuring 13.3 cm x 15.0 cm. The animals were observed continuously for 20 min., by observers blind to the experimental condition. The following chocolate withdrawal signs were counted: grooming, rearing, line crossing, time spent in central rectangles, teeth chattering, forepaw tremors, head shaking and wet-dog shakes.

Blood collection, brain and abdominal fat dissection:

Rats were sacrificed after 6 hours of fasting. Chow was removed at 7:00 h (at the beginning of the light period); fasting was done during the day to minimize the possibility that the rats ate close to tissue collection. Trunk blood was collected into heparinized tubes for determination of S100B protein. Plasma was separated and frozen at minus 20°C until the day of analysis.

After decapitation, the brain was quickly removed. For preparation of synaptic plasma membranes and determination of Na⁺,K⁺-ATPase activity, both hippocampus and amygdala were homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 0.32 M sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Synaptic plasma membranes from hippocampus and amygdala were prepared according to the method of Jones and Matus (1974) with some modifications (Wyse et al., 1998). The homogenate was centrifuged at 1000 × g for 10 min and the supernatant removed and centrifuged at 12,000 × g for 20 min. The pellet was then resuspended in hypotonic buffer (5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1) at 0°C for 30 min, and applied on a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at 69,000 × g for 120 min, the fraction between 0.8 and 1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

The two major portions of abdominal fat (gonadal and retroperitoneal adipose tissue depots) were dissected for S100B protein determination. Abdominal fat tissue was weighed using a scale with a precision of 0.0001g.

S100B protein quantification:

S100B protein was measured by ELISA, as previously described (Leite et al., 2008). Briefly, 50 µL of sample (diluted with PBS containing 0.2% albumin) plus 50 mM of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min (serum samples) or both antibodies were incubated together for 1 h (tissue samples). A colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm in a plate reader.

Na⁺,K⁺-ATPase activity assays:

The reaction mixture for Na⁺,K⁺-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in final volume of 200 μL. The reaction was initiated by ATP addition. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by Wyse et al. (1998). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Specific enzyme activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All samples were run in duplicates.

Statistical analysis:

Data were expressed as mean ± standard error of the mean, and were analyzed by Two-Way or Repeated Measures ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when indicated, or by Student's t test. Significance levels for all measures were set at $P < 0.05$. The number of animals used was estimated from previous experiments (Silveira et al., 2006; da Silva Benetti et al., 2007).

RESULTS*Consumption and body weight during chronic chocolate exposure*

The caloric consumption of both standard lab chow and chocolate during the 30-days-period did not differ between non-handled and neonatally handled females, considering the

mean consumption of each cage (Repeated Measures ANOVA, $P>0.05$ for handling, $n= 5-9$ cages/group). The total caloric consumption decreased in all groups overtime (Repeated Measures ANOVA, $P=0.016$, $n= 5-9$ cages/group), and animals receiving chocolate exhibited a higher total caloric intake (Repeated Measures ANOVA, $P=0.001$, $n= 5-9$ cages/group). Body weight also did not reach statistical significance between handled and non-handled rats overtime (Repeated Measures ANOVA, $P>0.05$ for handling, $n= 13-25$ rats/group); however, it was evident in the groups receiving chocolate as expected (Repeated Measures ANOVA, $P=0.008$, $n= 13-25$ rats/group). Tables 1A and 1B display these results.

Behavioral response to chocolate withdrawal

After the first 24 hours of chocolate withdrawal, the frequency of grooming, rearing, line crossing, teeth chattering, forepaw tremors, wet-dog shake, as well as, the time spent in central rectangles, did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet, $n= 12-16$ rats/group), and no interaction was detected. However, an interaction between group and diet was observed on head shakings after the first 24 hours of chocolate withdrawal, meaning that the chocolate withdrawal led to an increased frequency of head shakings in non-handled female rats when compared to handled animals (Two-Way ANOVA, $P=0.011$, $n= 11-15$ rats/group). Please, see these findings in Table 2.

Plasma and abdominal fat S100B protein after chronic chocolate exposure and withdrawal

When examining plasma S100B protein, we observed an interaction between group and diet, showing that non-handled female rats had an increase in S100B levels after chronic

exposure to chocolate (Two-Way ANOVA, $P=0.039$, $n= 9-12$ rats/group). Nevertheless, after 30 days of chocolate withdrawal the difference between the groups was not observed any longer (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet, $n= 4-5$ rats/group). These results are displayed in Figures 1A and 1B.

Regarding abdominal fat S100B protein, there was no difference between groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet, $n= 6-9$ rats/group, Figure 2) or interaction, not even when we evaluated inguinal and perirenal fat deposition individually after chocolate consumption (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet, $n= 6-9$ rats/group). Differences between handled and non-handled rats in abdominal fat deposition after chronic chocolate exposure and withdrawal were described in details previously (da Silva Benetti et al., 2007).

Amygdala and Hippocampus Na^+,K^+ -ATPase activity after chronic chocolate exposure and withdrawal

Chocolate consumption lead to a decrease in Na^+,K^+ -ATPase activity in amygdala of non-handled female rats (Two-Way ANOVA, interaction between group x diet, $P=0.033$, $n= 4$ rats/group). However, after the chocolate withdrawal period, the difference between the groups was not detectable anymore (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet, $n= 5$ rats/group), and no interaction was observed. These findings are shown in Figures 3A and 3B.

Considering the activity of this enzyme in hippocampus, non-handled animals exhibited decreased Na^+,K^+ -ATPase activity in this brain structure after chronic exposure to chocolate, while handled animals showed no difference (Two-Way ANOVA, interaction between group x diet, $P=0.047$, $n= 4$ rats/group). After the chocolate withdrawal period; however, Na^+,K^+ -ATPase activity in hippocampus did not differ between groups (Two-Way

ANOVA, $P > 0.05$ for handling and diet, $n = 5$ rats/group), no interaction was detected. Figures 4A and 4B display these results.

DISCUSSION

In the current study, we observed that neonatal handling determines a particular peripheral and central response to the chronic exposure to a highly palatable diet in adulthood. Non-handled female rats exhibited an increase in plasma S100B levels after chronic exposure to chocolate, while handled females did not show this effect. A recent study showed that S100B increases after weight gain (Holtkamp et al., 2008). In a sense, this goes in accordance to our findings in the non-handled group, which increased S100B levels after chocolate exposure and; therefore, weight gain. Interestingly, neonatally handled rats do not increase plasma S100B after chronic chocolate exposure although their body weight gain is equal to non-handled rats (da Silva Benetti et al., 2007), possibly meaning a differential metabolic regulation linked to body weight in these animals. In addition, the attenuated abdominal fat accumulation in neonatally handled rats compared to non-handled ones is in agreement with these findings of a different metabolic regulation, and with a possible role of S100B in such effects. In this study we saw that mean plasma S100B tended to be reduced in handled animals in both chow and chow+chocolate groups, although this difference was not statistically significant. It is interesting to note that a recent study reported an increased S100B levels in cerebrospinal fluid (CSF) in females exposed to maternal separation during the neonatal period (Diehl et al., 2007), suggesting that early life events may modulate the production of this protein and affect the neuroprotective characteristics of these animals in a long term.

Recently, it was demonstrated that S100B, previously assumed as CNS-specific, is produced in numerous non-cerebral tissues, for instance, in adipocytes (Steiner et al., 2007). In our study, however, the increase in plasma S100B levels induced by the chronic exposure to chocolate in non-handled rats seems to originate from the CNS, because S100B concentration in the abdominal fat did not differ between handled and non-handled female rats chronically exposed to highly palatable diet. Chronic exposure to a highly palatable diet including chocolate, such as the one used in this study, has been observed to increase DNA damage index in striatum and hippocampus of adult rats (Krolow et al., 2010). Therefore, the data as shown in the present study point out to a central origin, suggesting that the diet may influence S100B levels (Ziegler et al., 2004). Several conditions affecting the CNS have been demonstrated to influence serum S100B levels (Savola et al., 2004; Berger et al., 2005; Kleindienst et al., 2007; Gu et al., 2007), and a central origin has been suggested in these cases. However, we cannot rule out the possibility of a differential release rate of S100B by the fat tissue, since there is an increased abdominal fat deposition in non-handled female rats exposed to chocolate (da Silva Benetti et al., 2007).

In this study, non-handled female rats exhibited a decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity in both amygdala and hippocampus after long-term exposure to chocolate. This finding is in agreement with a previous description that cocoa has an inhibitory effect on Na^+, K^+ -ATPase activity in vitro (Harlan and Mann, 1982); however, the mechanisms involved in this effect remain unknown. Neonatally handled female rats chronically exposed to highly palatable diet did not have any alteration in Na^+, K^+ -ATPase activity in the brain structures assessed in the present study. This finding may suggest, again, a decreased susceptibility of neonatally handled animals to the effects of a chronic highly palatable diet. Considering the chronic chocolate exposure a stressor, one could propose that the lack of effect on neonatally handled rats could be mediated by the reduced stress response observed in these animals (Levine et al.,

1967; Panagiotaropoulos et al., 2004). After 30 days of chocolate withdrawal, Na⁺,K⁺-ATPase activity in non-handled rats was similar to their controls, demonstrating that the central and peripheral effects induced by the highly palatable diet are reversible upon the return to a regular diet.

An association between obesity and decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity in animal tissues (Iannello et al., 2007) has been recently reported. It is interesting to observe that non-handled animals receiving chocolate showed increased abdominal fat accumulation, while handled female rats did not (da Silva Benetti et al., 2007), and this obesity indicator could be correlated with the decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity observed in the current study. Since Na⁺,K⁺-ATPase is an enzyme responsible for maintaining membrane potential, energizing the Na⁺-K⁺-pump and consuming ATP (Erecińska and Silver, 1994), this enzyme might play an important role in energy expenditure and the development of metabolic diseases such as obesity. Another explanation for this decreased activity in non-handled animals might be a peripheral action from the adipose tissue, inhibiting the central activity of the enzyme and inducing an imbalance in the energy expenditure. This imbalance could further contribute to the abdominal fat accumulation observed in non-handled rats exposed to chocolate in a feed-forward process. Moreover, the changes in Na⁺,K⁺-ATPase activity observed in both hippocampus and amygdala in this study could be due to an altered amount of this enzyme in the synaptic membranes or to changes in its efficiency (activity) for example, induced by oxidative processes, as has already been reported (Jamme et al., 1995, Rauchová et al., 1999, Zarros et al., 2008).

Neonatal handling induces long-lasting hippocampal modifications in the rat, as neonatally-handled animals have been demonstrated to exhibit increased neurotrophin levels, cell proliferation, glucocorticoid receptor mRNA density, and glucocorticoid receptor gene expression (O'Donnel et al., 1994, Jutapakdeegul et al., 2003, Ladd et al., 2004, Lemaire et

al., 2006, Cirulli et al., 2007) in this structure. These persistent effects of neonatal handling on hippocampus account for the effect of this postnatal intervention on the decreased responsiveness to stress observed in this group of animals in adulthood (Levine et al., 1967; Panagiotaropoulos et al., 2004). In the current study, handled female rats were protected against a decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus induced by the chronic exposure to chocolate. One possible explanation for this finding could be the neurochemical alterations; i.e. enhanced negative feedback of GCs and increased GCs receptors, previously described in handled rats (Levine et al., 1967; Meaney et al. 1989), which possibly would induce a decreased susceptibility to the effects of chronic chocolate consumption on hippocampus. We may also suggest a Na^+, K^+ -ATPase regulation by the glucocorticoids receptors (GR), since handled animals have an increased concentration of GR in the hippocampus (Levine et al., 1967; Meaney et al. 1989), these animals could regulate the neural metabolism in a specific way, modifying the neuron vulnerability and reducing the effects of a highly palatable diet on Na^+, K^+ -ATPase activity.

In the current study, non-handled female rats chronically exposed to chocolate exhibited an increased frequency of head shaking after 24 hours of chocolate withdrawal. Despite the fact that the other withdrawal parameters measured did not differ between groups, the great frequency of head shaking is in accordance with a previous description of increased signs of withdrawal after 24 hours of highly palatable diet deprivation in animals chronically exposed to it (Colantuoni et al., 2002). In addition, it has been demonstrated that S100B protein levels increase in drug-dependent individuals with high drug consumption (Liappas et al., 2006). The activity of cerebral Na^+, K^+ -ATPase has also been reported to be modulated by drugs of abuse, such as morphine (Wu et al., 2007), and it has been proposed that the impairment of Na^+, K^+ -ATPase function is related to opioid tolerance and dependence (Taylor and Fleming, 2001). Considering the evidence that palatable food interacts with cerebral

opioids and dopamine, producing effects similar to those of drugs of abuse (Avena et al., 2008), it is possible that neonatally-handled rats have a reward system that is less responsive to chocolate withdrawal in comparison to non-handled animals. This would be in agreement with the description that neonatal handling lead to a decrease in the responsiveness of mesolimbic dopamine system to psychostimulants (Brake et al., 2004), and have a decreased dopamine turnover in the nucleus accumbens (Silveira et al., 2009).

In summary, neonatally-handled female rats are less susceptible to the effects of chronic exposure to chocolate on plasma S100B protein levels, as well as on Na⁺,K⁺-ATPase activity in amygdala and hippocampus. We suggest that neonatal handling may prevent not only peripheral but also central alterations induced by a long-term exposure to a highly palatable diet, decreasing the vulnerability to metabolic and neural alterations. It remains to be established if this resilience carries out any adaptive value or benefit in the long term; this knowledge can contribute to the understanding on how early life determines individual variations in the susceptibility to certain conditions.

REFERENCES

1. Avena N.M., Rada P., Hoebel B.G., 2008. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 20-39.
2. Berger R.P., Adelson P.D., Pierce M.C., Dulani T., Cassidy L.D., Kochanek P.M., 2005. Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and noninflicted traumatic brain injury in children. *J. Neurosurg.* 103, 61-68.

3. Brake W.G., Zhang T.Y., Diorio J., Meaney M.J., Gratton A., 2004. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1863-1874.
4. Branchi I., Santucci D., Alleva E., 2001. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav. Brain. Res.* 125, 49-56.
5. Chan K.M., Delfert D., Junger K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ - stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
6. Cirulli F., Capone F., Bonsignore L.T., Aloe L., Alleva E., 2007. Early behavioural enrichment in the form of handling renders mouse pups unresponsive to anxiolytic drugs and increases NGF levels in the hippocampus. *Behav. Brain. Res.* 178, 208-215.
7. Clifton P.G., Vickers S.P., Somerville E.M., 1998. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behav. Neurosci.* 112, 502-511.
8. Colantuoni C., Rada P., McCarthy J., Patten C., Avena N.M., Chadeayne A., Hoebel B.G., 2002. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obes. Res.* 10, 478-488.
9. Diehl L.A., Silveira P.P., Leite M.C., Crema L.M., Portella A.K., Billodre M.N., Nunes E., Henriques T.P., Fidelix-da-Silva L.B., Heis M.D., Gonçalves C.A., Quillfeldt J.A., Dalmaz C., 2007. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain. Res.* 1144, 107-116.
10. Erecińska M., Silver I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43, 37-71.

11. Giraud S.Q., Kotz C.M., Billington C.J., Levine A.S., 1998. Association between the amygdala and nucleus of the solitary tract in mu-opioid induced feeding in the rat. *Brain. Res.* 802, 184-188.
12. Gu X.H., Zhang G., Zhang X.Q., Song Y., Wang T., Li S.X., 2007. Clinical values of detection of serum levels of S100B and NSE in diagnosis of brain injuries at early period after cardiopulmonary bypass. *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* 87, 975-977.
13. Harlan D.M., Mann G.V., 1982. A factor in food which impairs Na⁺-K⁺-ATPase in vitro. *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 250-257.
14. Holtkamp K., Bühren K., Ponath G., von Eiff C., Herpertz-Dahlmann B., Hebebrand J., Rothermundt M., 2008. Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain. *J. Neural. Transm.* 115, 937-940.
15. Iannello S., Milazzo P., Belfiore F., 2007. Animal and human tissue Na,K-ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation. *Am. J. Med. Sci.* 333, 1-9.
16. Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J.M., Nouvelot A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport.* 7, 333-337.
17. Jones D.H., Matus A.I., 1974. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.* 356, 276-287.
18. Jutapakdeegul N., Casalotti S.O., Govitrapong P., Kotchabhakdi N., 2003. Postnatal touch stimulation acutely alters corticosterone levels and glucocorticoid receptor gene expression in the neonatal rat. *Dev. Neurosci.* 25, 26-33.

19. Kleindienst A., Hesse F., Bullock M.R., Buchfelder M., 2007. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog. Brain. Res.* 161, 317-325.
20. Ladd C.O., Thirivikraman K.V., Huot R.L., Plotsky P.M., 2005. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology.* 30, 520-533.
21. Ladd C.O., Huot R.L., Thirivikraman K.V., Nemeroff C.B., Plotsky P.M., 2004. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol. Psychiatry.* 55, 367-375.
22. Leite M.C., Galland F., Brolese G., Guerra M.C., Bortolotto J.W., Freitas R., Almeida L.M., Gottfried C., Gonçalves C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods.* 169, 93-99.
23. Lemaire V., Lamarque S., Le Moal M., Piazza P.V., Abrous D.N., 2006. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry.* 59, 786-792.
24. Levine S., Haltmeyer G.C., Karas G.G., Denenberg V.H., 1967. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol. Behav.* 2, 55-59.
25. Liappas I., Tzavellas E.O., Kariyannis C., Piperi C., Schulpis C., Papassotiriou I., Soldatos C.R., 2006. Effect of alcohol detoxification on serum S-100B levels of alcohol-dependent individuals. *In Vivo.* 20, 675-680.
26. Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J., 1997. Maternal care, hippocampal

glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 277, 1659-1662.

27. Marenholz I, Heizmann C.W., Fritz G., 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1111-1122.
28. Mazzini G.S., Schaf D.V., Oliveira A.R., Gonçalves C.A., Belló-Klein A., Bordignon S., Bruch R.S., Campos G.F., Vassallo D.V., Souza D.O., Portela L.V., 2005. The ischemic rat heart releases S100B. *Life Sci.* 77, 882-889.
29. Meaney M.J., Aitken D.H., Sharma S., Viau V., Sarrieau A., 1989. Postnatal handling increases hippocampal type II glucocorticoid receptors and enhances adrenocorticoid negative feedback efficacy in the rat. *Neuroendocrinology.* 50, 597–604.
30. O'Donnell D., Larocque S., Seckl J.R., Meaney M.J., 1994. Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralocorticoid messenger RNA expression in the hippocampus of adult rats. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 26, 242-248.
31. Padoin M.J., Cadore L.P., Gomes C.M., Barros H.M., Lucion A.B., 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav. Neurosci.* 115, 1332-1340.
32. Panagiotaropoulos T., Papaioannou A., Pondiki S., Prokopiou A., Stylianopoulou F., Gerozissis K., 2004. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology.* 79, 109-118.
33. Pfeifer R., Ferrari M., Börner A., Deufel T., Figulla H.R., 2008. Serum concentration of NSE and S-100b during LVAD in non-resuscitated patients. *Resuscitation.* 79, 46-53.
34. Pryce C.R., Bettschen D., Feldon J., 2001. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev. Psychobiol.* 38, 239-251.

35. Rauchová H., Drahotka Z., Koudelová J., 1999. The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Physiol Res.* 48, 73-78.
36. Savola O., Pyhtinen J., Leino T.K., Siitonen S., Niemelä O., Hillbom M., 2004. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J. Trauma.* 56, 1229-1234.
37. Scaccianoce S., Del Bianco P., Pannitteri G., Passarelli F., 2004. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein. *Brain. Res.* 1004, 208-211.
38. Schulpis K.H., Margeli A., Akalestos A., Vlachos G.D., Partsinevelos G.A., Papastamataki M., Antsaklis A., Papassotiriou I., 2006. Effects of mode of delivery on maternal-neonatal plasma antioxidant status and on protein S100B serum concentrations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 66, 733-742.
39. da Silva Benetti C., Silveira P.P., Portella A.K., Diehl L.A., Nunes E., de Oliveira V.S., Dalmaz C., Goldani M.Z., 2007. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr. Res.* 62, 405-411.
40. Silveira P.P., Portella A.K., Clemente Z., Bassani E., Tabajara A.S., Gamaro G.D., Dantas G., Torres I.L., Lucion A.B., Dalmaz C., 2004. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol. Behav.* 80, 739-745.
41. Silveira P.P., Portella A.K., Assis S., Nieto F.B., Diehl L.A., Crema L.M., Peres W., Costa G., Scorza C., Quillfeldt J.A., Lucion A.B., Dalmaz C., 2009. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int. J. Dev. Neurosci.* DOI 10.1016/j.ijdevneu.2009.08.018.

42. Silveira P.P., da Silva Benetti C., Ayres C., Pederiva F.Q., Portella A.K., Lucion A.B., Dalmaz C., 2006. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav. Brain. Res.* 173, 205-210.
43. Steiner J., Bernstein H.G., Bielau H., Berndt A., Brisch R., Mawrin C., Keilhoff G., Bogerts B., 2007. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC. Neurosci.* 8, 2.
44. Taylor D.A., Fleming W.W., 2001. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 11-18.
45. Wu Z.Q., Chen J., Chi Z.Q., Liu J.G., 2007. Involvement of dopamine system in regulation of Na⁺,K⁺-ATPase in the striatum upon activation of opioid receptors by morphine. *Mol. Pharmacol.* 71, 519-530.
46. Wyse A.T., Brusque A.M., Silva C.G., Streck E.L., Wajner M., Wannmacher C.M., 1998. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport.* 9, 1719-1721.
47. Zarros A., Theocharis S., Skandali N., Tsakiris S., 2008. Effects of fulminant hepatic encephalopathy on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na⁺),K⁽⁺⁾)- and Mg⁽²⁺⁾-ATPase: comparison of the enzymes' response to in vitro treatment with ammonia. *Metab. Brain. Dis.* 23, 255-264.
48. Ziegler D.R., Oliveira D.L., Pires C., Ribeiro L., Leite M., Mendez A., Gonçalves D., Tramontina F., Portela L.V., Wofchuk S.T., Perry M.L., Gonçalves C.A., 2004. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci. Res.* 50, 375-379.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Plasma S100B protein after chronic chocolate exposure and chocolate withdrawal in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of plasma S100B protein after chronic exposure to chocolate. $N= 9-12$ rats/group. Chocolate consumption increased S100B protein in non-handled female rats (Two-Way ANOVA, interaction between group \times diet, $P<0.039$). * Significantly different from all other groups (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of plasma S100B protein after chocolate withdrawal. $N= 4-5$ rats/group. After 30 days of chocolate withdrawal, these levels did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

Figure 2: Abdominal fat S100B protein after chronic chocolate exposure in handled and non-handled adult female rats. Data are expressed as mean \pm S.E.M. $N= 6-9$ rats/group. During chocolate consumption, abdominal fat S100B protein did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

Figure 3: Amygdala Na^+, K^+ -ATPase activity after chronic chocolate exposure and chocolate withdrawal in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of Na^+, K^+ -ATPase activity after chocolate chronic exposure. $N= 4$ rats/group. An interaction between group \times diet showed that chocolate consumption decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in amygdala of non-handled rats (Two-Way ANOVA, $P=0.033$). * Significantly different from non-handled group receiving chow only (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of Na^+, K^+ -ATPase activity after chocolate withdrawal period. $N= 5$ rats/group. After 30 days of chocolate withdrawal, Na^+, K^+ -ATPase activity did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

Figure 4: Hippocampal Na^+, K^+ -ATPase activity after chronic chocolate exposure and chocolate withdrawal in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of Na^+, K^+ -ATPase activity after chronic chocolate exposure. $N= 4$ rats/group. Chocolate consumption decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus of non-handled female rats (Two-Way ANOVA, interaction between group x diet, $P=0.047$). * Significantly different from all other groups (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of Na^+, K^+ -ATPase activity after chocolate withdrawal period. $N= 5$ rats/group. There was no difference between the groups in Na^+, K^+ -ATPase activity, after 30-days-period of chocolate withdrawal (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

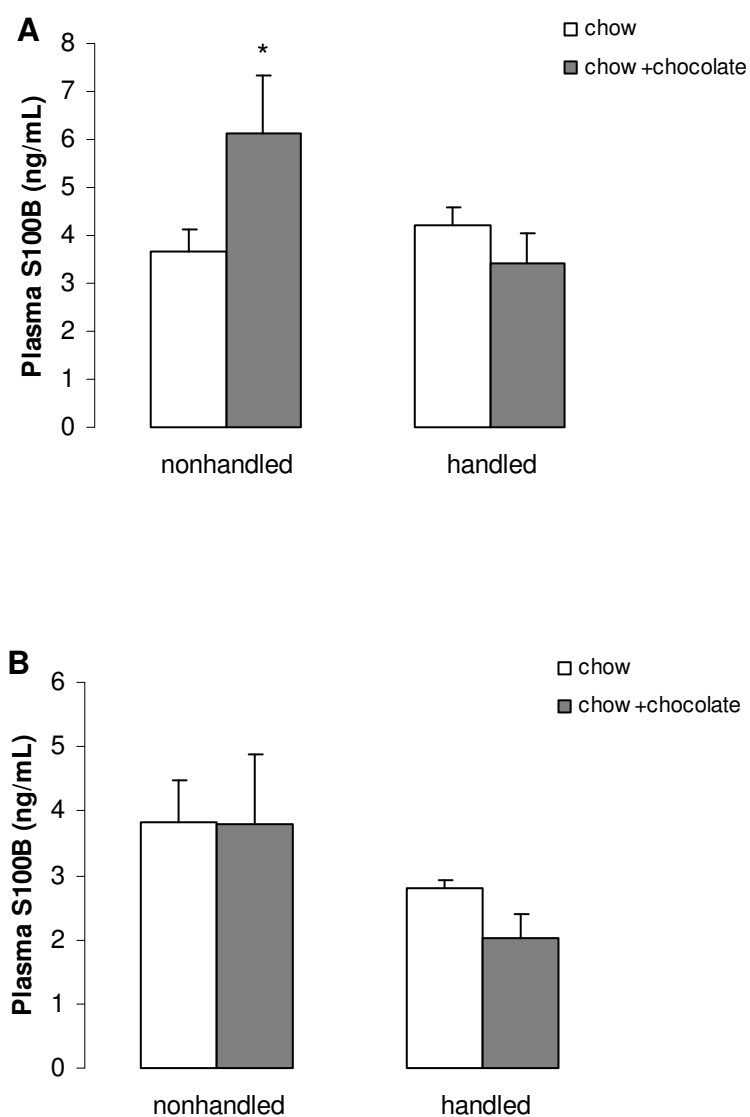


Figure 1: Plasma S100B protein after chronic chocolate exposure and chocolate withdrawal in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of plasma S100B protein after chronic exposure to chocolate. $N= 9-12$ rats/group. Chocolate consumption increased S100B protein in non-handled female rats (Two-Way ANOVA, interaction between group \times diet, $P<0.039$). * Significantly different from all other groups (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of plasma S100B protein after chocolate withdrawal. $N= 4-5$ rats/group. After 30 days of chocolate withdrawal, these levels did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

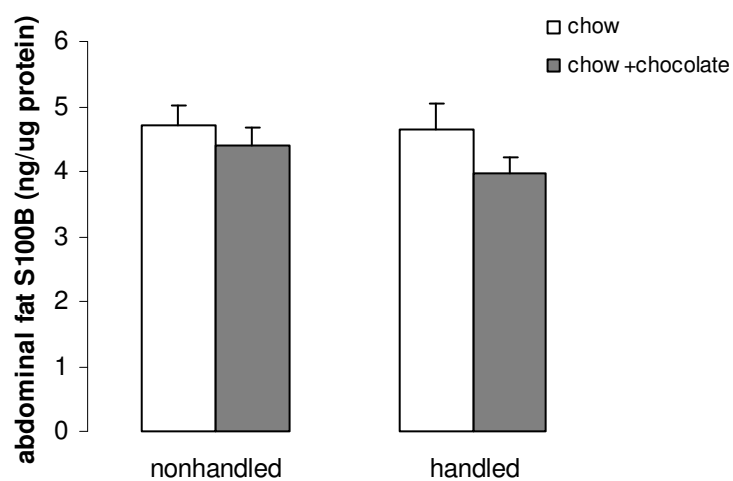


Figure 2: Abdominal fat S100B protein after chronic chocolate exposure in handled and non-handled adult female rats. Data are expressed as mean \pm S.E.M. $N= 6-9$ rats/group. During chocolate consumption, abdominal fat S100B protein did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

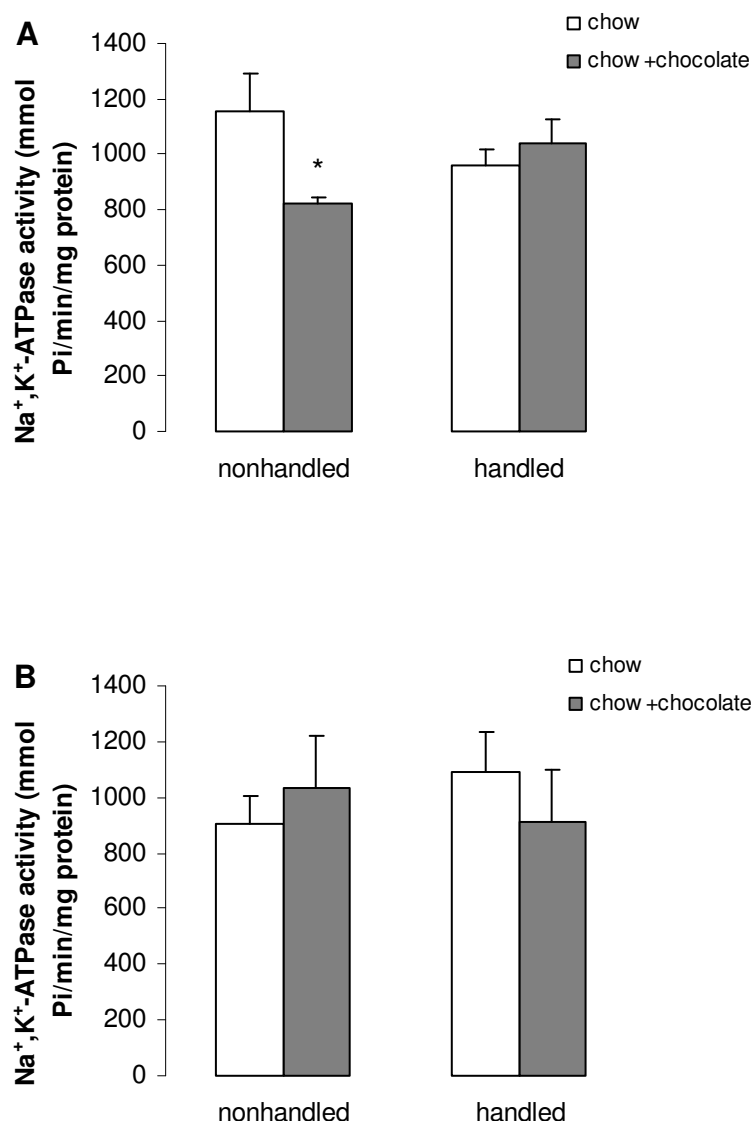


Figure 3: Amygdala Na⁺,K⁺-ATPase activity after chronic chocolate exposure and chocolate withdrawal in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of Na⁺,K⁺-ATPase activity after chronic chocolate exposure. $N= 4$ rats/group. An interaction between group \times diet showed that chocolate consumption decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity in amygdala of non-handled rats (Two-Way ANOVA, $P=0.033$). * Significantly different from non-handled group receiving chow only (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of Na⁺,K⁺-ATPase activity after chocolate withdrawal period. $N= 5$ rats/group. After 30 days of chocolate withdrawal, Na⁺,K⁺-ATPase activity did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

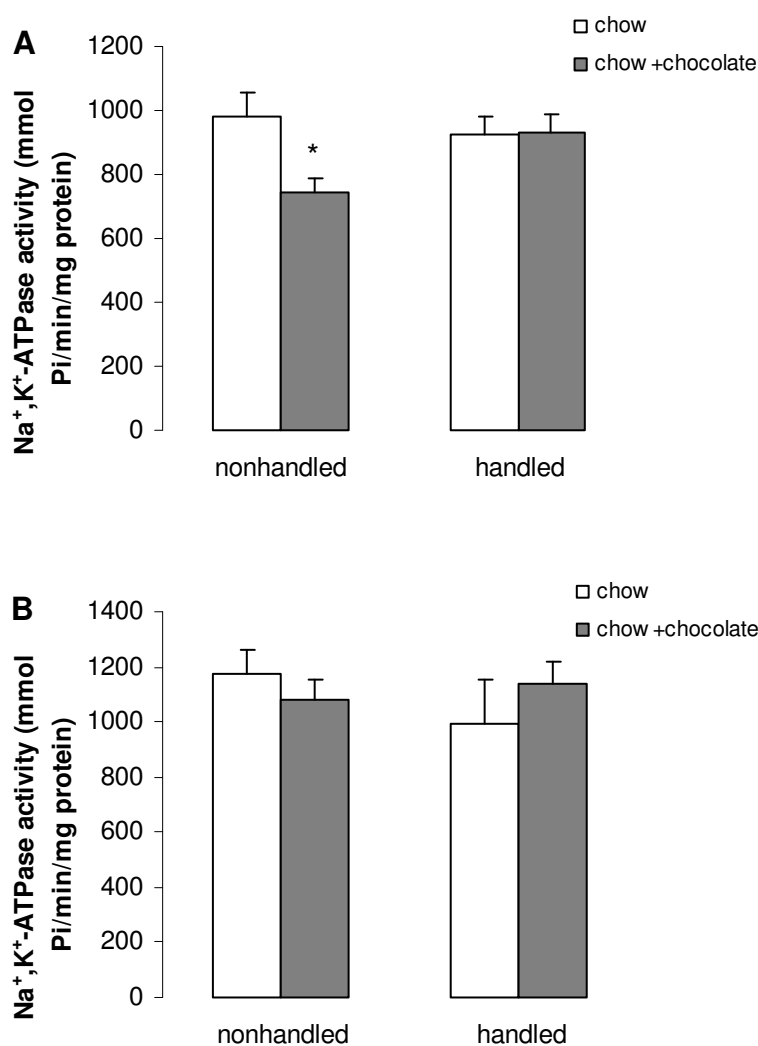


Figure 4: Hippocampal Na^+, K^+ -ATPase activity after chronic chocolate exposure and chocolate withdrawal in handled and non-handled adult female rats. (A) Mean \pm S.E.M of Na^+, K^+ -ATPase activity after chronic chocolate exposure. $N= 4$ rats/group. Chocolate consumption decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus of non-handled female rats (Two-Way ANOVA, interaction between group \times diet, $P=0.047$). * Significantly different from all other groups (Duncan's multiple range test, $P= 0.05$). (B) Mean \pm S.E.M of Na^+, K^+ -ATPase activity after chocolate withdrawal period. $N= 5$ rats/group. There was no difference between the groups in Na^+, K^+ -ATPase activity, after 30-days-period of chocolate withdrawal (Two-Way ANOVA, $P>0.05$ for handling and diet).

Table 1A. Total caloric consumption of the diets used in the study.

Group		Day 1	Day 6	Day 12	Day 18	Day 24	Day 30
NH	Chow only	40.5±6.3	45.7±3.1	47.3±3.2	47.8±4.1	49.6±3.3	52.3±7.8
	Chow+ chocolate	74.4±4.4	63.1±3.3	55.5±2.6	48.9±4.8	58.2±3.3	57.3±4.8
H	Chow only	48.4±5.1	51.1±3.7	48.9±1.3	45.2±7.6	45.3±3.2	42.9±3.0
	Chow+ chocolate	75.8±4.2	59.8±5.1	53.4±3.6	56.4±4.4	52.5±1.4	51.8±5.4

Data are shown as mean \pm S.E.M. Total caloric consumption decreased in all groups overtime (Repeated Measures ANOVA, $P=0.016$, $n= 5-9$ cages/group); however, it was not different between neonatally handled and non-handled rats (Repeated Measures ANOVA, $P>0.05$ for handling, $n= 5-9$ cages/group).

Table 1B. Body weight (g) during the 30-days-period of chronic chocolate exposure.

Group		Basal	1 st Week	2 nd Week	3 rd Week	4 th Week
NH	Chow only	227.8±6.8	226.8±5.9	231.5±7.0	235.0±7.1	239.5±7.2
	Chow+ chocolate	223.6±8.2	229.3±9.0	231.8±8.9	233.1±9.4	237.8±9.3
H	Chow only	225.7±5.7	229.5±5.5	228.5±6.3	229.8±5.8	231.5±6.5
	Chow+ Chocolate	219.8±6.9	229.3±6.9	230.0±7.5	232.3±7.4	236.9±7.1

Data are shown as mean \pm S.E.M. Body weight did not differ between handled and non-handled groups overtime (Repeated Measures ANOVA, $P>0.05$ for handling, $n= 6-12$ rats/group). On the other hand, animals receiving chocolate exhibited a more evident increase in the body weight overtime as expected (Repeated Measures ANOVA, $P=0.011$, $n= 6-12$ rats/group).

Table 2. Withdrawal signs after 24 hours of chocolate deprivation in handled and non-handled adult female rats.

Group		Grooming (sec.)	Rearing (n°)	Crossing (n°)	TCR (sec.)	Teeth chatterin g (n°)	Head shaking (n°)	Wet-dog shake (n°)
NH	Chow only	206.2±22.1	86.9±6.9	176.3±15.8	18.7±2.5	3.9±1.0	1.2±0.3	0.3±0.2
	Chow+ chocolate	129.5±9.6	79.4±9.2	180.3±21.9	18.4±3.7	4.0±1.1	3.0±0.8*	0.3±0.2
H	Chow only	147.1±21.7	66.9±5.9	127.8±16.7	17.7±3.7	7.9±3.9	4.8±1.1	ND
	Chow+ chocolate	148.5±36.6	66.7±11.6	179.3±18.9	18.4±3.6	4.2±1.4	2.6±0.8	0.3±0.2

Data are shown as mean \pm S.E.M. *Abbreviations:* TCR= time spent in central rectangles; ND= not demonstrated. Non-handled rats exhibited greater frequency of head shaking after chocolate withdrawal than handled animals (Two-Way ANOVA, interaction between group x diet, $P=0.011$, $n= 11-15$ rats/group). * Significantly different from handled group receiving chocolate. The other signs of withdrawal did not differ between the groups (Two-Way ANOVA, $P>0.050$, $n= 12-16$ rats/group). Forepaw tremors data were not shown in the Table 1, because this withdrawal sign was not demonstrated by any rat in the open field.

Título: Efeitos da exposição crônica a uma dieta hiperpalatável e da sua retirada sobre a atividade cerebral da Na⁺,K⁺-ATPase e os níveis da proteína S100B no plasma de ratas adultas manipuladas no período neonatal.

Título resumido: Manipulação neonatal, dieta palatável crônica, abstinência e metabolismo.

Lista de autores: Carla da S. Benetti*^{1,4}; Patrícia P. Silveira^{1,4}; Cristiane Matté³; Francieli M. Stefanello³; Marina C. Leite³; Carlos Alberto S. Gonçalves^{2,3}; Angela T. S. Wyse³; Carla Dalmaç^{2,3}; Marcelo Z. Goldani^{1,4}.

¹PPG Saúde da Criança e do Adolescente, FAMED, UFRGS (postal code: 90035-003), ²PPG Neurociências, ICBS, UFRGS (90046-900), ³Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS (90035-003) e ⁴Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS (90035-903). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Endereço de contato: Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco

90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Fone: 051- 3359-8515

Fax: 051- 3359-8001

Email: mgoldani@hcpa.ufrgs.br (Goldani, MZ).

Suporte financeiro: CNPq, Capes and FINEP/Rede IBNnet.

RESUMO

Em nossos estudos prévios foi demonstrado que o ambiente precoce influencia a resposta metabólica, afetando o depósito de gordura abdominal de ratas fêmeas adultas expostas a uma dieta hipercalórica a longo prazo. No presente estudo, nosso objetivo foi verificar os efeitos da exposição crônica a uma dieta hiperpalatável (chocolate) sobre a atividade cerebral da Na^+, K^+ -ATPase e a concentração da proteína S100B no plasma, assim como sobre a resposta a abstinência dessa dieta em ratas adultas manipuladas e não manipuladas no período neonatal. Foram medidos o consumo dos alimentos (ração-padrão de laboratório e chocolate), ganho de peso corporal, a concentração da proteína S100B, bem como a atividade cerebral da Na^+, K^+ -ATPase durante a exposição crônica e após a abstinência de chocolate em ratas fêmeas adultas que haviam sido expostas ou não à manipulação neonatal (10 min/dia, 10 primeiros dias de vida). Ratas não manipuladas no período neonatal e expostas cronicamente ao chocolate na vida adulta exibiram níveis aumentados de S100B no plasma, porém a concentração desta proteína na gordura abdominal não foi diferente entre os grupos. O consumo crônico de chocolate reduziu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em ambas estruturas cerebrais, amígdala e hipocampo de ratas não manipuladas, mas não nas ratas manipuladas no período neonatal, além disso, esse efeito sobre a atividade da enzima desapareceu após a abstinência de chocolate. Ratas fêmeas não manipuladas também demonstraram uma maior frequência de tremores de cabeça na tarefa de campo aberto, após 24 horas de abstinência de chocolate em comparação com ratas manipuladas no início da vida. Esses achados sugerem que a manipulação neonatal modifica a vulnerabilidade para alterações metabólicas e cerebrais induzidas pela exposição crônica a uma dieta hiperpalatável na vida adulta.

Palavras-chave: estresse neonatal, manipulação neonatal, comportamento alimentar, alimento hiperpalatável, gordura abdominal, proteína S100B, Na⁺,K⁺-ATPase, abstinência.

Abreviações: HPA, eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

INTRODUÇÃO

A manipulação neonatal é um modelo experimental proposto para avaliar os efeitos do ambiente precoce sobre vários desfechos na vida adulta. Este protocolo é caracterizado por uma separação breve, repetida e aparentemente inócua da mãe no período neonatal, a qual está associada com o aumento do cuidado materno (Liu et al., 1997; Branchi et al., 2001; Pryce et al., 2001). A literatura descreve amplamente que animais manipulados no período neonatal apresentam uma menor resposta ao estresse quando adultos (Levine et al., 1967; Padoin et al., 2001; Panagiotaropoulos et al., 2004) e tal efeito é observado em situações de estresse agudo (Meaney et al., 1989) bem como crônico (Panagiotaropoulos et al., 2004; Ladd et al., 2005).

Adicionalmente, animais manipulados consomem mais alimentos palatáveis durante a exposição aguda a esse tipo de alimento em comparação aos seus controles (Silveira et al., 2006; da Silva Benetti et al., 2007). Em um estudo prévio de nosso laboratório, descrevemos uma influência protetora da manipulação neonatal sobre o depósito de gordura abdominal (da Silva Benetti et al., 2007) de ratas fêmeas adultas expostas cronicamente a uma dieta hipercalórica e hiperpalatável. Assim, foi sugerido que uma resposta metabólica específica a dietas hipercalóricas oferecidas cronicamente, poderia proteger as ratas fêmeas manipuladas contra os efeitos prejudiciais deste desafio ambiental (dieta) na vida adulta.

A Na^+, K^+ -ATPase é uma importante enzima responsável pela geração e manutenção do potencial de membrana necessários para a excitabilidade neuronal. Algumas doenças metabólicas, como por exemplo, a obesidade e o diabetes tipo 2, foram descritas por induzir uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Iannello et al., 2007). Por outro lado, a S100B é uma proteína acopladora de cálcio, predominantemente expressa pelos astrócitos no cérebro de vertebrados (Marenholz et al., 2004), embora algumas evidências sugiram sua produção

em outros tecidos não cerebrais, tais como os adipócitos (Steiner et al., 2007). Níveis aumentados de S100B no soro foram identificados após a exposição ao estresse em animais (Scaccianoce et al., 2004; Diehl et al., 2007) e em humanos (Schulpis et al., 2006). A concentração de S100B no soro é influenciada pela dieta assim como pelo ganho de peso corporal (Holtkamp et al., 2008). Estudos epidemiológicos e experimentais demonstram que a isquemia cardíaca está associada com um aumento nos níveis da proteína S100B no soro (Pfeifer et al., 2008; Mazzini et al., 2005).

Em nossos achados anteriores, a manipulação neonatal atenuou o aumento na gordura abdominal, bem como nos níveis de triglicerídios, após exposição crônica a uma dieta hiperpalatável na vida adulta (da Silva Benetti et al., 2007). Dessa forma, no presente estudo utilizamos um protocolo de exposição à dieta hipercalórica e hiperpalatável crônica (chocolate) e à sua abstinência visando melhor compreender de que maneira a manipulação no início da vida afeta a resposta metabólica na idade adulta. Então, tentando entender os possíveis mecanismos envolvidos nesses achados prévios, o presente estudo avaliou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo e na amígdala, duas estruturas cerebrais classicamente descritas por estarem envolvidas na regulação do comportamento alimentar (Clifton et al., 1998; Giraud et al., 1998). Adicionalmente, os níveis da proteína S100B no soro foram mensurados após a exposição crônica à dieta hiperpalatável, assim como após o período de abstinência dessa dieta. Nossa hipótese é de que os animais manipulados no período neonatal sejam menos vulneráveis aos efeitos metabólicos da exposição crônica à dieta hiperpalatável bem como da abstinência dessa dieta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais

Ratas Wistar prenhes provenientes do Instituto de Biociências (UFRGS) foram randomicamente selecionadas. Os animais foram colocados individualmente em caixas-moradia confeccionadas em *Plexiglas* (65 x 25 x 15 cm) com piso coberto por maravalha e foram mantidos em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12h (luzes acesas entre 07:00 h e 19:00 h), temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, limpeza semanal das caixas, ração padrão e água *ad libitum*. Todas as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes nas primeiras 24h após o nascimento e mantidas intactas, exceto para os procedimentos de manipulação que foram realizados entre às 09:00h e 11:00h. O pesquisador tinha o cuidado de trocar as luvas entre a manipulação de cada ninhada, para evitar a dispersão de qualquer tipo de odor de uma ninhada para outra.

O dia do nascimento foi considerado o dia 0 (zero). As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no dia 21 pós-natal. Foram utilizadas duas fêmeas da mesma ninhada para o mesmo grupo, considerando os 4 grupos (ver abaixo). Após o desmame, as ratas fêmeas foram mantidas em torno de quatro a cinco por caixa, em ambiente controlado (conforme descrito acima) e sem qualquer tipo de manipulação até o início da exposição ao alimento palatável (dia 60). Um total de 48 ratas fêmeas foi utilizado em diferentes experimentos, sendo essas derivadas de 15 ninhadas. A linha do tempo esquematiza os experimentos (Figura 1). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

Modelo de Manipulação Neonatal

Grupo não-manipulado: Filhotes permaneceram com a mãe, sem manipulação neonatal, até o desmame. A limpeza rotineira das caixas foi interrompida durante esse período.

Grupo manipulado: Este procedimento foi realizado conforme anteriormente descrito (17). A mãe foi gentilmente afastada para um lado da caixa-moradia e os filhotes foram removidos do ninho e colocados dentro de uma caixa limpa forrada com papel toalha. Então, a ninhada foi colocada em uma incubadora ajustada para manter uma temperatura ambiente de 30-32°C (temperatura da água de 34° C), enquanto a mãe foi mantida na caixa-moradia posicionada ao lado da incubadora. Após 10 minutos, os filhotes (machos e fêmeas) retornaram para sua respectiva mãe. Toda a ninhada foi manipulada ao mesmo tempo (machos e fêmeas), entretanto, após o desmame, machos foram utilizados em outro experimento. Este procedimento foi realizado do dia 1 ao dia 10 pós-natal, em seguida, os filhotes foram mantidos com a mãe, sem manipulação, até o dia 21 pós-natal.

Exposição à dieta hiperpalatável

A partir do dia 60 de vida, as ratas foram habituadas a um novo ambiente contendo um alimento novo. Neste experimento, as fêmeas foram colocadas individualmente em uma caixa retangular (40 x 15 x 20 cm) com partes inferior e laterais revestidas em madeira e parte superior em vidro transparente. Uma porção de chocolate pesada previamente (chocolate ao leite – Neugebauer®) foi colocada em uma das extremidades da caixa-corredor. As ratas foram habituadas a esse ambiente por 5 dias, durante 3 minutos cada dia, sob restrição alimentar (recebendo em torno de 80% do consumo habitual). No 6º dia, as ratas foram

testadas para o consumo de alimento palatável, após terem recebido ração padrão *ad libitum* nas 24 horas prévias. Esses procedimentos foram realizados para verificar se as ratas fêmeas comeriam o chocolate da mesma forma que elas comumente ingerem outros tipos de alimentos palatáveis (15), com e sem restrição alimentar. Após esse período de habituação, as ratas receberam ração padrão *ad libitum*. No 83º dia de vida, todas as ratas foram pesadas e randomizadas em diferentes grupos, sendo colocadas em números de 3 a 4 por caixa. Os grupos foram subdivididos em 1) Não-manipulada + ração padrão, 2) Não-manipulada + chocolate + ração padrão, 3) Manipulada + ração padrão e 4) Manipulada + chocolate + ração padrão. Uma semana depois, grupos específicos começaram a receber chocolate, com ração padrão, *ad libitum* na caixa-moradia. Durante 30 dias, porções previamente pesadas de chocolate e de ração padrão foram oferecidas, e a quantidade restante foi medida diariamente para avaliar o consumo. O consumo de alimentos foi medido por caixa e então dividido pelo número de animais em cada caixa para determinar o consumo médio por animal. A Tabela 1 descreve a composição nutricional das dietas utilizadas no estudo. Passados 30 dias de exposição à dieta palatável, um grupo de animais foi sacrificado por decapitação após 6 horas de jejum. Os consumos de ração e chocolate, assim como os dados de preferência pelo alimento palatável foram descritos em detalhes previamente (17) e foram reproduzidos neste estudo.

Privação da dieta hiperpalatável

Após a exposição crônica ao chocolate, um grupo específico de ratas fêmeas foi privado de chocolate durante 30 dias, recebendo somente ração padrão e água *ad libitum*.

Resposta comportamental à privação de chocolate – Tarefa de Campo aberto

Após as primeiras 24 horas de privação de chocolate, as ratas foram avaliadas quanto a presença de sinais espontâneos de abstinência da dieta hiperpalatável. Elas foram colocadas, individualmente, dentro de uma caixa de madeira e com parede frontal de vidro transparente medindo 50 x 40 x 60 cm. O assoalho foi igualmente dividido em 12 retângulos do mesmo tamanho (13,3 x 15,0 cm). As ratas foram observadas diretamente e continuamente por pesquisadores cegos para a condição experimental, durante um período de 20 minutos. Cada rata foi testada uma única vez. Durante esse período de observação foram registrados os seguintes sinais de abstinência: movimentos de limpeza de patas e corpo, permanência em posição estendida nas patas traseiras, número de cruzamentos nos retângulos, tempo de permanência nos retângulos centrais, tremores de dentes e patas dianteiras, movimentos de cabeça e corpo. Esses componentes representam sinais provocados pela interrupção abrupta do consumo de chocolate.

Amostras de sangue, dissecação de estruturas cerebrais e gordura abdominal

Os animais foram sacrificados por decapitação após 6h de jejum. A ração padrão foi removida às 7:00h (início do ciclo claro); o jejum foi realizado durante o dia para minimizar a possibilidade dos animais consumirem algum alimento próximo ao horário da coleta dos tecidos. O sangue do tronco encefálico foi coletado em tubos contendo anti-coagulante (heparina) para a determinação da proteína S100B. O plasma foi separado e congelado a -20°C até o dia das análises.

O cérebro foi removido imediatamente após decapitação. O hipocampo e a amígdala foram dissecados para preparar as membranas sinápticas para a determinação da atividade da

enzima Na^+, K^+ -ATPase. O hipocampo e a amígdala foram homogeneizados em 10 volumes (1:10, w/v) de 0,32 M de solução de sacarose contendo 5,0 mM HEPES e 0,1 mM EDTA, pH 7,4. As membranas sinápticas do hipocampo e da amígdala foram preparadas seguindo o protocolo de Jones e Matus (1974) com algumas modificações (Wyse et al., 1998). O homogeneizado foi centrifugado a $1000 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi removido e centrifugado a $12,000 \times g$ durante 20 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em solução tampão hipotônico (5,0 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,1) a 0°C por 30 minutos, e aplicado sobre um gradiente de densidade descontínua de sacarose consistindo de camadas sucessivas de 0,3; 0,8 e 1,0 M. Após centrifugação a $69,000 \times g$ durante 120 minutos, a fração na interface entre sacarose 0,8 e 1,0 M foi assumida como a preparação da membrana da enzima.

As duas maiores porções da gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas para determinação da proteína S100B. O tecido de gordura abdominal foi pesado utilizando uma balança com precisão de 0,0001g.

Determinação da S100B no plasma e na gordura abdominal

A concentração da proteína S100B foi determinada pelo método de ELISA, conforme protocolo de Leite e colaboradores (2008). O mesmo protocolo foi utilizado para medir os níveis de S100B no plasma, assim como sua concentração na gordura abdominal. Um volume de 50 μL de amostra (diluído com tampão fosfato salina contendo 0,2% de albumina) adicionado a 50 mM de solução tampão Tris foi incubado por 2 h em uma placa de ELISA previamente coberta com anticorpo anti-S100B (SH-B1) monoclonal. As placas foram lavadas com tampão de lavagem. Anti-S100B policlonal foi adicionado e incubado por 30 minutos e então as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. O anticorpo secundário (*peroxidase-conjugated anti-rabbit*) foi adicionado para mais 30 minutos de

incubação (amostras de plasma) ou ambos anticorpos foram incubados juntos por 1 hora (amostras de tecido). As placas foram novamente lavadas. A reação colorimétrica com *o*-fenilenodiamina foi mensurada a 492 nm no leitor de placa de ELISA.

Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase cerebral

A análise da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase nas estruturas cerebrais foram realizadas conforme o que se segue. O reagente de mistura para a determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase continha 5,0 mM MgCl₂, 80,0 mM NaCl, 20,0 mM KCl e 40,0 mM Tris-HCl, pH 7,4, em um volume final de 200 µL. A reação foi iniciada através da adição de ATP. Amostras controles foram determinadas sob as mesmas condições com a adição de 1,0 mM de ouabaina. A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi calculada pela diferença entre as duas determinações, conforme descrito previamente por Wyse e colaboradores (1998). O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi medido através do método de Chan e colaboradores (1986). A atividade específica da enzima foi expressa em nmol de Pi liberado por minuto por mg de proteína. Todas as medidas foram realizadas em duplicatas.

Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA de duas vias ou ANOVA de medidas repetidas, seguidas pelo teste post-hoc de Duncan quando indicado, ou por teste t de *Student*. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%. O número de animais utilizado foi estimado a partir de experimentos prévios (Silveira et al., 2006; da Silva Benetti et al., 2007).

RESULTADOS

Consumo e peso corporal durante a exposição crônica ao chocolate

O consumo calórico de ração padrão e chocolate durante o período de 30 dias de exposição não diferiu entre as ratas fêmeas manipuladas e não-manipuladas no período neonatal, considerando o consumo médio de cada caixa-moradia (ANOVA de Medidas Repetidas, $P > 0,05$ para manipulação, $n = 5-9$ caixas/grupo). O consumo calórico total diminuiu em todos os grupos experimentais com o passar do tempo (ANOVA de Medidas Repetidas, $P = 0,016$, $n = 5-9$ caixas/grupo) e as ratas que receberam chocolate apresentaram um maior consumo calórico total (ANOVA de Medidas Repetidas, $P = 0,001$, $n = 5-9$ caixas/grupo). O peso corporal também não alcançou significância estatística entre ratas manipuladas e não-manipuladas ao longo do tempo (ANOVA de Medidas Repetidas, $P > 0,05$ para manipulação, $n = 13-25$ ratas/grupo), entretanto, o ganho de peso foi evidente nos grupos expostos ao chocolate, conforme esperado (ANOVA de Medidas Repetidas, $P = 0,008$, $n = 13-25$ ratas/grupo). As Tabelas 1A e 1B mostram esses resultados.

Resposta comportamental à abstinência de chocolate

Após as primeiras 24 horas de retirada do chocolate, alguns dos sinais de abstinência avaliados, como por exemplo: a frequência de movimentos de limpeza de patas e corpo, a permanência em posição estendida nas patas traseiras, o número de cuzamentos nos retângulos, os tremores de dentes e patas dianteiras, os movimentos de corpo, bem como o tempo de permanência nos retângulos centrais, não foram diferentes entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$ para manipulação e dieta, $n = 12-16$ ratas/grupo) e nenhuma interação foi

detectada. Entretanto, uma interação entre grupo e dieta foi observada quando os movimentos de cabeça foram analisados após as primeiras 24 horas de abstinência de chocolate, mostrando que a privação desse alimento hiperpalatável induziu a uma frequência aumentada dos movimentos de cabeça em ratas fêmeas não-manipuladas quando comparadas com ratas manipuladas no período neonatal (ANOVA de duas vias, $P=0,011$, $n= 11-15$ ratas/grupo). Esses resultados são mostrados na Tabela 2.

Concentração de proteína S100B no plasma e na gordura abdominal após exposição crônica e abstinência de chocolate

Quando analisados os níveis plasmáticos de S100B, observamos uma interação entre grupo e dieta, indicando que ratas fêmeas não-manipuladas possuem níveis aumentados de S100B no plasma após exposição crônica ao chocolate (ANOVA de duas vias, $P=0,039$, $n= 9-12$ ratas/grupo). No entanto, após o período de 30 dias de abstinência ao chocolate esta diferença entre os grupos, descrita acima, não mostrou significância estatística (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta, $n= 4-5$ ratas/grupo). Tais resultados estão dispostos nas Figuras 1A e 1B.

A concentração de protein S100B na gordura abdominal não foi diferente entre os grupos analisados (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta, $n= 6-9$ ratas/grupo, Figura 2) nenhuma interação foi observada, nem mesmo quando as duas maiores porções do depósito de gordura abdominal (inguinal e perirenal) foram avaliadas individualmente após o consumo crônico de chocolate (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta, $n= 6-9$ ratas/grupo). As diferenças detectadas entre ratas fêmeas manipuladas e não-manpuladas no depósito de gordura abdominal, após o período de

exposição crônica ao chocolate e de abstinência, foram descritos em detalhes previamente (da Silva Benetti et al., 2007).

Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase na amígdala e no hipocampo após o período de exposição crônica ao chocolate e de abstinência

O consumo de chocolate induziu a uma redução na atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase na amígdala de ratas fêmeas não-manipuladas no período neonatal (ANOVA de duas vias, interação entre grupo e dieta, $P=0,033$, $n= 4$ ratas/grupo). Entretanto, após o período de abstinência ao chocolate, a diferença entre os grupos não foi mais detectada (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta, $n= 5$ ratas/grupo) e nenhuma interação foi observada. Esses resultados são apresentados nas Figuras 3A e 3B.

Considerando a atividade da enzima no hipocampo, ratas não-manipuladas exibiram uma atividade diminuída da Na⁺,K⁺-ATPase nessa estrutura cerebral, após exposição crônica ao chocolate, enquanto que nenhuma diferença foi observada nas ratas manipuladas (ANOVA de duas vias, interação entre grupo e dieta, $P=0,047$, $n= 4$ ratas/grupo). Após o período de abstinência, a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo não diferiu entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta, $n= 5$ ratas/grupo) e nenhuma interação foi detectada. As Figuras 4A e 4B mostram esses achados.

DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a manipulação neonatal determina uma resposta periférica e central específica a exposição crônica a dieta hiperpalatável na vida adulta. Ratas fêmeas não-manipuladas exibiram níveis aumentados de S100B no plasma após serem

cronicamente expostas ao chocolate, entretanto esse efeito não foi observado em ratas manipuladas no período neonatal. Um estudo recente demonstrou aumentos nos níveis da proteína S100B após o ganho de peso corporal (Holtkamp et al., 2008). De certa maneira, esse achado vai de encontro com nossos resultados no grupo de ratas não-manipuladas, as quais exibiram níveis aumentados de S100B após a exposição crônica ao chocolate e, como consequência, maior ganho de peso corporal. Interessantemente, ratas manipuladas no período neonatal não sofreram aumento nos níveis de S100B no plasma após exposição crônica ao chocolate, embora apresentassem ganho de peso igual ao de ratas não-manipuladas (da Silva Benetti et al., 2007), possivelmente indicando uma regulação metabólica particular, ligada ao peso corporal nessas ratas. Adicionalmente, o acúmulo de gordura abdominal atenuado nas ratas manipuladas nos primeiros dias de vida comparado com ratas não-manipuladas está de acordo com esses achados de regulação metabólica diferencial e com um possível papel da S100B em tais efeitos. No presente estudo, observamos que os níveis médios de S100B no plasma tenderam a ser reduzidos nas ratas fêmeas manipuladas nos dois grupos de dietas (ração-padrão e ração-padrão+chocolate), embora esta diferença não tenha atingido significância estatística. É relevante notar que um estudo recente mostrou níveis aumentados de S100B no fluido cérebro-espinhal em ratas fêmeas adultas expostas à separação materna durante o período neonatal (Diehl et al., 2007), sugerindo que eventos precoces podem modular a produção de tal proteína e afetar as características neuroprotetoras destes animais a longo prazo.

Mais recentemente, foi demonstrado que a proteína S100B, previamente assumida como uma proteína específica do SNC, é também produzida em diversos tecidos não-cerebrais, como por exemplo, nos adipócitos (Steiner et al., 2007). Entretanto, em nosso estudo, o aumento nos níveis de S100B no plasma induzido pela exposição ao chocolate em ratas não-manipuladas parece ter origem no SNC, visto que a concentração da proteína S100B

na gordura abdominal não diferiu entre os grupos de ratas manipuladas e não-manipuladas cronicamente expostas à dieta hiperpalatável. Outras investigações, também utilizando o chocolate, têm demonstrado que a exposição a longo prazo a uma dieta hiperpalatável induz um aumento no índice de dano ao DNA, em estruturas cerebrais como o estriado e o hipocampo de animais adultos (Krolow et al., 2010). Dessa forma, os dados apresentados no presente estudo indicam uma origem central da proteína, sugerindo que os níveis de S100B podem ser influenciados pela dieta (Ziegler et al., 2004). Inúmeras condições que afetam o SNC foram descritas por influenciar os níveis de S100B no soro (Savola et al., 2004; Berger et al., 2005; Kleindienst et al., 2007; Gu et al., 2007) e, nesses casos, uma origem central foi sugerida. No entanto, nós não podemos descartar a possibilidade de uma taxa de liberação diferencial da proteína S100B pelo tecido adiposo, visto que existe um aumentado depósito de gordura abdominal nas ratas fêmeas não-manipuladas, cronicamente expostas ao chocolate (da Silva Benetti et al., 2007).

Ratas fêmeas não-manipuladas, no presente estudo, exibiram uma redução na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em estruturas cerebrais como a amígdala e o hipocampo após exposição a longo prazo ao chocolate. Este resultado está de acordo com uma descrição prévia de um efeito inibitório do cacau sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase *in vitro* (Harlan and Mann, 1982), entretanto, os mecanismos envolvidos nesse efeito necessitam de maiores esclarecimentos. A exposição crônica à dieta hiperpalatável não alterou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em ratas manipuladas no período neonatal nas duas estruturas cerebrais avaliadas nesse estudo. Novamente, esse achado pode sugerir uma diminuída suscetibilidade dos animais manipulados no início da vida aos efeitos de uma dieta hiperpalatável oferecida cronicamente. Considerando a exposição crônica ao chocolate um fator estressor, propõe-se que a ausência de efeito nas ratas fêmeas manipuladas poderia ser mediada pela reduzida resposta ao estresse amplamente descrita nesses animais (Levine et al., 1967;

Panagiotaropoulos et al., 2004). Após o período de 30 dias de abstinência ao chocolate, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase nas ratas não-manipuladas foi semelhante a de seus controles, demonstrando que os efeitos centrais e periféricos, induzidos pela dieta hiperpalatável, são reversíveis com o retorno da dieta regular.

Recentemente, uma associação entre obesidade e reduzida atividade da Na^+, K^+ -ATPase em tecidos de animais foi relatada (Iannello et al., 2007). É relevante observar que ratas fêmeas não-manipuladas no período neonatal, demonstraram um maior acúmulo de gordura abdominal após exposição ao chocolate, em comparação com ratas manipuladas (da Silva Benetti et al., 2007), assim, esse indicador de obesidade poderia estar correlacionado com a reduzida atividade da Na^+, K^+ -ATPase descrita no presente estudo. Sendo a Na^+, K^+ -ATPase uma enzima responsável pela manutenção do potencial de membrana, fornecendo energia para a bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ e consumindo grande quantidade de ATP (Erecińska and Silver, 1994), essa enzima poderia desempenhar um papel importante no metabolismo energético, mais especificamente no gasto de energia e no desenvolvimento de doenças metabólicas, tais como a obesidade. Uma explicação alternativa para essa redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase nas ratas não-manipuladas seria uma ação periférica proveniente do tecido adiposo, inibindo a atividade central da enzima e induzindo um desequilíbrio no gasto energético. Esse desbalanço poderia contribuir mais tarde para o acúmulo de gordura abdominal observado nas ratas não-manipuladas expostas ao chocolate, de forma semelhante a um processo de pró-alimentação (*feed-forward process*). Além disso, as alterações na atividade da Na^+, K^+ -ATPase, identificadas no hipocampo e na amígdala, podem ser devido a uma quantidade alterada dessa enzima nas membranas sinápticas ou a mudanças na sua eficiência (atividade) induzidas por processos oxidativos por exemplo, conforme reportado na literatura (Jamme et al., 1995, Rauchová et al., 1999, Zarros et al., 2008).

A manipulação neonatal induz modificações hipocampais duradouras no rato. Sabe-se que animais manipulados nos primeiros dias de vida exibem aumentados níveis de neurotrofinas, aumentada proliferação celular, bem como aumentada densidade do mRNA para receptores de glicocorticóides e da expressão gênica dos receptores de glicocorticóides no hipocampo (O'Donnell et al., 1994, Jutapakdeegul et al., 2003, Ladd et al., 2004, Lemaire et al., 2006, Cirulli et al., 2007). Esses efeitos persistentes da manipulação neonatal sobre o hipocampo são responsáveis pelo efeito desta intervenção pós-natal sobre a diminuída responsividade ao estresse identificada nesses animais na vida adulta (Levine et al., 1967; Panagiotaropoulos et al., 2004). No presente estudo, ratas fêmeas manipuladas foram protegidas contra uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo induzida pela exposição crônica ao chocolate. Uma possível explicação para esse achado incluiria as alterações neuroquímicas, isto é, a realçada retro-alimentação negativa dos GCs e o número aumentado de receptores para GCs, previamente descritos em ratos manipulados (Levine et al., 1967; Meaney et al. 1989), que possivelmente induziriam a uma diminuída suscetibilidade aos efeitos do consumo crônico de chocolate sobre o hipocampo. Podemos também sugerir uma regulação na atividade da Na^+, K^+ -ATPase através dos receptores de glicocorticóides. Considerando, que animais manipulados exibem uma concentração aumentada desses receptores no hipocampo (Levine et al., 1967; Meaney et al. 1989), tais animais poderiam regular o metabolismo neuronal de uma maneira específica, modificando a vulnerabilidade do neurônio e reduzindo os efeitos de uma dieta hiperpalatável sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

Em nosso estudo, ratas não-manipuladas cronicamente expostas ao chocolate exibiram uma maior frequência de movimentos de cabeça após 24 horas de abstinência ao chocolate. Apesar dos outros parâmetros de abstinência medidos nesse estudo não diferirem entre os grupos, a maior frequência desses movimentos de cabeça vai de encontro com uma descrição

prévia de sinais aumentados de abstinência, após 24 horas de privação da dieta hiperpalatável em animais cronicamente expostos a esse tipo de dieta (Colantuoni et al., 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que os níveis da proteína S100B aumentam em indivíduos dependentes de drogas de abuso que apresentam um consumo elevado das mesmas (Liappas et al., 2006). A atividade cerebral da Na^+, K^+ -ATPase é também descrita por ser modulada por drogas de abuso, como por exemplo, a morfina (Wu et al., 2007) e alguns autores propõem que a função prejudicada da enzima Na^+, K^+ -ATPase está relacionada com a tolerância e a dependência a opióides (Taylor and Fleming, 2001). Considerando a evidência de que o alimento palatável interage com opióides cerebrais e dopamina, produzindo efeitos semelhantes aqueles gerados por drogas de abuso (Avena et al., 2008), é possível que ratas manipuladas no período neonatal tenham um sistema de recompensa menos responsivo a abstinência de chocolate em comparação com ratas não-manipuladas. Isto estaria em concordância com a descrição de que a manipulação neonatal induz a uma diminuição na responsividade do sistema dopaminérgico-mesolímbico a psico-estimulantes (Brake et al., 2004) e que animais manipulados têm um menor *turnover* de dopamina no núcleo acumbens (Silveira et al., 2009).

Em conclusão, ratas fêmeas manipuladas no período neonatal são menos suscetíveis aos efeitos da exposição crônica ao chocolate sobre os níveis da proteína S100B no plasma, assim como sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase na amígdala e no hipocampo. Nosso estudo sugere que a manipulação nos primeiros dias de vida pode prevenir não somente modificações periféricas como também centrais induzidas pela exposição a longo prazo à dieta hiperpalatável, reduzindo a vulnerabilidade a alterações metabólicas e neuronais. Ainda não está estabelecido se esta resiliência carrega algum valor adaptativo ou algum benefício a longo prazo; esse conhecimento pode contribuir para melhor compreender de que forma um

evento precoce na vida é capaz de determinar variações individuais na suscetibilidade a desfechos distintos.

REFERÊNCIAS

1. Avena N.M., Rada P., Hoebel B.G., 2008. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 20-39.
2. Berger R.P., Adelson P.D., Pierce M.C., Dulani T., Cassidy L.D., Kochanek P.M., 2005. Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and noninflicted traumatic brain injury in children. *J. Neurosurg.* 103, 61-68.
3. Brake W.G., Zhang T.Y., Diorio J., Meaney M.J., Gratton A., 2004. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1863-1874.
4. Branchi I., Santucci D., Alleva E., 2001. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav. Brain. Res.* 125, 49-56.
5. Chan K.M., Delfert D., Junger K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ - stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
6. Cirulli F., Capone F., Bonsignore L.T., Aloe L., Alleva E., 2007. Early behavioural enrichment in the form of handling renders mouse pups unresponsive to anxiolytic drugs and increases NGF levels in the hippocampus. *Behav. Brain. Res.* 178, 208-215.
7. Clifton P.G., Vickers S.P., Somerville E.M., 1998. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behav. Neurosci.* 112, 502-511.

8. Colantuoni C., Rada P., McCarthy J., Patten C., Avena N.M., Chadeayne A., Hoebel B.G., 2002. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obes. Res.* 10, 478-488.
9. Diehl L.A., Silveira P.P., Leite M.C., Crema L.M., Portella A.K., Billodre M.N., Nunes E., Henriques T.P., Fidelix-da-Silva L.B., Heis M.D., Gonçalves C.A., Quillfeldt J.A., Dalmaz C., 2007. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain. Res.* 1144, 107-116.
10. Erecińska M., Silver I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43, 37-71.
11. Giraud S.Q., Kotz C.M., Billington C.J., Levine A.S., 1998. Association between the amygdala and nucleus of the solitary tract in mu-opioid induced feeding in the rat. *Brain. Res.* 802, 184-188.
12. Gu X.H., Zhang G., Zhang X.Q., Song Y., Wang T., Li S.X., 2007. Clinical values of detection of serum levels of S100B and NSE in diagnosis of brain injuries at early period after cardiopulmonary bypass. *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* 87, 975-977.
13. Harlan D.M., Mann G.V., 1982. A factor in food which impairs Na⁺-K⁺-ATPase in vitro. *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 250-257.
14. Holtkamp K., Bühren K., Ponath G., von Eiff C., Herpertz-Dahlmann B., Hebebrand J., Rothermundt M., 2008. Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain. *J. Neural. Transm.* 115, 937-940.
15. Iannello S., Milazzo P., Belfiore F., 2007. Animal and human tissue Na,K-ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation. *Am. J. Med. Sci.* 333, 1-9.

16. Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J.M., Nouvelot A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport*. 7, 333-337.
17. Jones D.H., Matus A.I., 1974. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta*. 356, 276-287.
18. Jutapakdeegul N., Casalotti S.O., Govitrapong P., Kotchabhakdi N., 2003. Postnatal touch stimulation acutely alters corticosterone levels and glucocorticoid receptor gene expression in the neonatal rat. *Dev. Neurosci*. 25, 26-33.
19. Kleindienst A., Hesse F., Bullock M.R., Buchfelder M., 2007. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog. Brain. Res*. 161, 317-325.
20. Ladd C.O., Thirivikraman K.V., Huot R.L., Plotsky P.M., 2005. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology*. 30, 520-533.
21. Ladd C.O., Huot R.L., Thirivikraman K.V., Nemeroff C.B., Plotsky P.M., 2004. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol. Psychiatry*. 55, 367-375.
22. Leite M.C., Galland F., Brolese G., Guerra M.C., Bortolotto J.W., Freitas R., Almeida L.M., Gottfried C., Gonçalves C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods*. 169, 93-99.

23. Lemaire V., Lamarque S., Le Moal M., Piazza P.V., Abrous D.N., 2006. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry*. 59, 786-792.
24. Levine S., Haltmeyer G.C., Karas G.G., Denenberg V.H., 1967. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol. Behav.* 2, 55-59.
25. Liappas I., Tzavellas E.O., Kariyannis C., Piperi C., Schulpis C., Papassotiriou I., Soldatos C.R., 2006. Effect of alcohol detoxification on serum S-100B levels of alcohol-dependent individuals. *In Vivo*. 20, 675-680.
26. Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 277, 1659-1662.
27. Marenholz I., Heizmann C.W., Fritz G., 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1111-1122.
28. Mazzini G.S., Schaf D.V., Oliveira A.R., Gonçalves C.A., Belló-Klein A., Bordignon S., Bruch R.S., Campos G.F., Vassallo D.V., Souza D.O., Portela L.V., 2005. The ischemic rat heart releases S100B. *Life Sci.* 77, 882-889.
29. Meaney M.J., Aitken D.H., Sharma S., Viau V., Sarrieau A., 1989. Postnatal handling increases hippocampal type II glucocorticoid receptors and enhances adrenocorticoid negative feedback efficacy in the rat. *Neuroendocrinology*. 50, 597-604.
30. O'Donnell D., Larocque S., Seckl J.R., Meaney M.J., 1994. Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralocorticoid messenger RNA expression in the hippocampus of adult rats. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 26, 242-248.

31. Padoin M.J., Cadore L.P., Gomes C.M., Barros H.M., Lucion A.B., 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav. Neurosci.* 115, 1332-1340.
32. Panagiotaropoulos T., Papaioannou A., Pondiki S., Prokopiou A., Stylianopoulou F., Gerozissis K., 2004. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology.* 79, 109-118.
33. Pfeifer R., Ferrari M., Börner A., Deufel T., Figulla H.R., 2008. Serum concentration of NSE and S-100b during LVAD in non-resuscitated patients. *Resuscitation.* 79, 46-53.
34. Pryce C.R., Bettschen D., Feldon J., 2001. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev. Psychobiol.* 38, 239-251.
35. Rauchová H., Drahotka Z., Koudelová J., 1999. The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Physiol Res.* 48, 73-78.
36. Savola O., Pyhtinen J., Leino T.K., Siitonen S., Niemelä O., Hillbom M., 2004. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J. Trauma.* 56, 1229-1234.
37. Scaccianoce S., Del Bianco P., Pannitteri G., Passarelli F., 2004. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein. *Brain. Res.* 1004, 208-211.
38. Schulpis K.H., Margeli A., Akalestos A., Vlachos G.D., Partsinevelos G.A., Papastamataki M., Antsaklis A., Papassotiriou I., 2006. Effects of mode of delivery on maternal-neonatal plasma antioxidant status and on protein S100B serum concentrations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 66, 733-742.

39. da Silva Benetti C., Silveira P.P., Portella A.K., Diehl L.A., Nunes E., de Oliveira V.S., Dalmaz C., Goldani M.Z., 2007. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr. Res.* 62, 405-411.
40. Silveira P.P., Portella A.K., Clemente Z., Bassani E., Tabajara A.S., Gamaro G.D., Dantas G., Torres I.L., Lucion A.B., Dalmaz C., 2004. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol. Behav.* 80, 739-745.
41. Silveira P.P., Portella A.K., Assis S., Nieto F.B., Diehl L.A., Crema L.M., Peres W., Costa G., Scorza C., Quillfeldt J.A., Lucion A.B., Dalmaz C., 2009. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int. J. Dev. Neurosci.* DOI 10.1016/j.ijdevneu.2009.08.018.
42. Silveira P.P., da Silva Benetti C., Ayres C., Pederiva F.Q., Portella A.K., Lucion A.B., Dalmaz C., 2006. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav. Brain Res.* 173, 205-210.
43. Steiner J., Bernstein H.G., Bielau H., Berndt A., Brisch R., Mawrin C., Keilhoff G., Bogerts B., 2007. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC. Neurosci.* 8, 2.
44. Taylor D.A., Fleming W.W., 2001. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 11-18.
45. Wu Z.Q., Chen J., Chi Z.Q., Liu J.G., 2007. Involvement of dopamine system in regulation of Na⁺,K⁺-ATPase in the striatum upon activation of opioid receptors by morphine. *Mol. Pharmacol.* 71, 519-530.

46. Wyse A.T., Brusque A.M., Silva C.G., Streck E.L., Wajner M., Wannmacher C.M., 1998. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport*. 9, 1719-1721.
47. Zarros A., Theocharis S., Skandali N., Tsakiris S., 2008. Effects of fulminant hepatic encephalopathy on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na⁺),K⁽⁺⁾)- and Mg⁽²⁺⁾-ATPase: comparison of the enzymes' response to in vitro treatment with ammonia. *Metab. Brain. Dis.* 23, 255-264.
48. Ziegler D.R., Oliveira D.L., Pires C., Ribeiro L., Leite M., Mendez A., Gonçalves D., Tramontina F., Portela L.V., Wofchuk S.T., Perry M.L., Gonçalves C.A., 2004. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci. Res.* 50, 375-379.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Níveis de S100B no plasma após exposição crônica ao chocolate e após abstinência da dieta em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M de proteína S100B no plasma após exposição crônica ao chocolate. $N= 9-12$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou os níveis de S100B em ratas não-manipuladas (ANOVA de duas vias, interação entre grupo x dieta, $P<0,039$). * Significativamente diferente de todos os outros grupos (teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M dos níveis de S100B no plasma após abstinência de chocolate. $N= 4-5$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, esses níveis não diferiram entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

Figura 2: Proteína S100B na gordura abdominal após exposição crônica ao chocolate em ratas adultas manipuladas e não-manipuladas. Dados são expressos em média \pm E.P.M. $N= 6-9$ ratas/grupo. Durante o consumo de chocolate, a concentração de S100B na gordura abdominal não foi diferente entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

Figura 3: Atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase na amígdala após exposição crônica ao chocolate e após abstinência da dieta em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após exposição crônica ao chocolate. $N= 4$ ratas/grupo. Uma interação entre grupo x dieta mostrou que o consumo de chocolate reduziu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase na amígdala de ratas não-manipuladas (ANOVA de duas vias, $P=0,033$). * Significativamente diferente do grupo não-manipulado que recebeu somente ração-padrão (teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M

da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após o período de abstinência de chocolate. $N= 5$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase não diferiu entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

Figura 4: Atividade hipocampal da Na^+, K^+ -ATPase após exposição crônica ao chocolate e após abstinência da dieta em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após exposição crônica ao chocolate. $N= 4$ ratas/grupo. O consumo de chocolate diminuiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo de ratas não-manipuladas (ANOVA de duas vias, interação entre grupo x dieta, $P=0,047$). * Significativamente diferente de todos os outros grupos (teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após abstinência o período de abstinência de chocolate. $N= 5$ ratas/grupo. Nenhuma diferença foi observada na atividade da Na^+, K^+ -ATPase entre os grupos, após o período de 30 dias de privação de chocolate (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

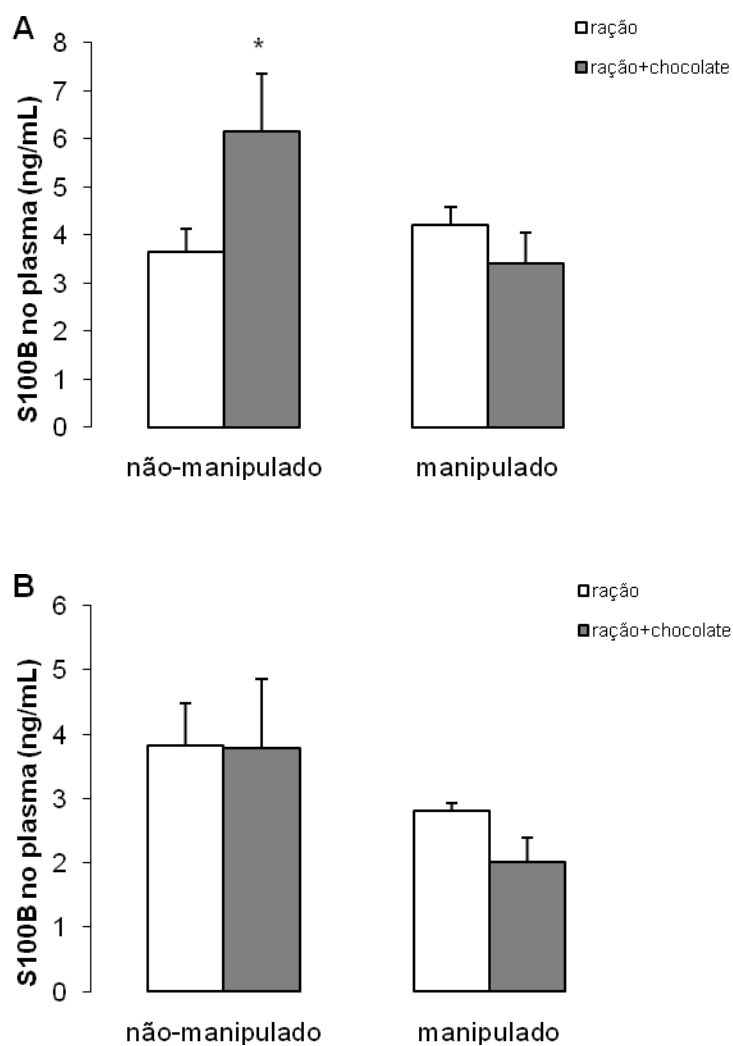


Figura 1: Níveis de S100B no plasma após exposição crônica ao chocolate e após abstinência da dieta em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M de proteína S100B no plasma após exposição crônica ao chocolate. $N= 9-12$ ratas/grupo. O consumo de chocolate aumentou os níveis de S100B em ratas não-manipuladas (ANOVA de duas vias, interação entre grupo x dieta, $P<0,039$). * Significativamente diferente de todos os outros grupos (teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M dos níveis de S100B no plasma após abstinência de chocolate. $N= 4-5$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, esses níveis não diferiram entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

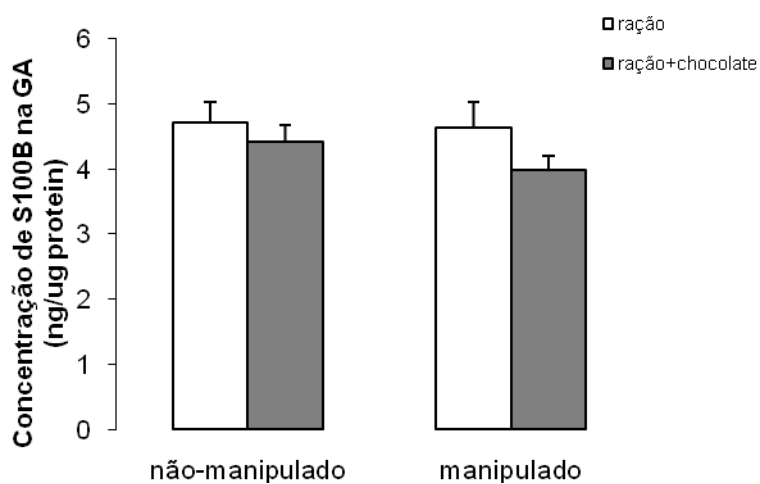


Figura 2: Proteína S100B na gordura abdominal após exposição crônica ao chocolate em ratas adultas manipuladas e não-manipuladas. Dados são expressos em média \pm E.P.M. $N= 6-9$ ratas/grupo. Durante o consumo de chocolate, a concentração de S100B na gordura abdominal não foi diferente entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

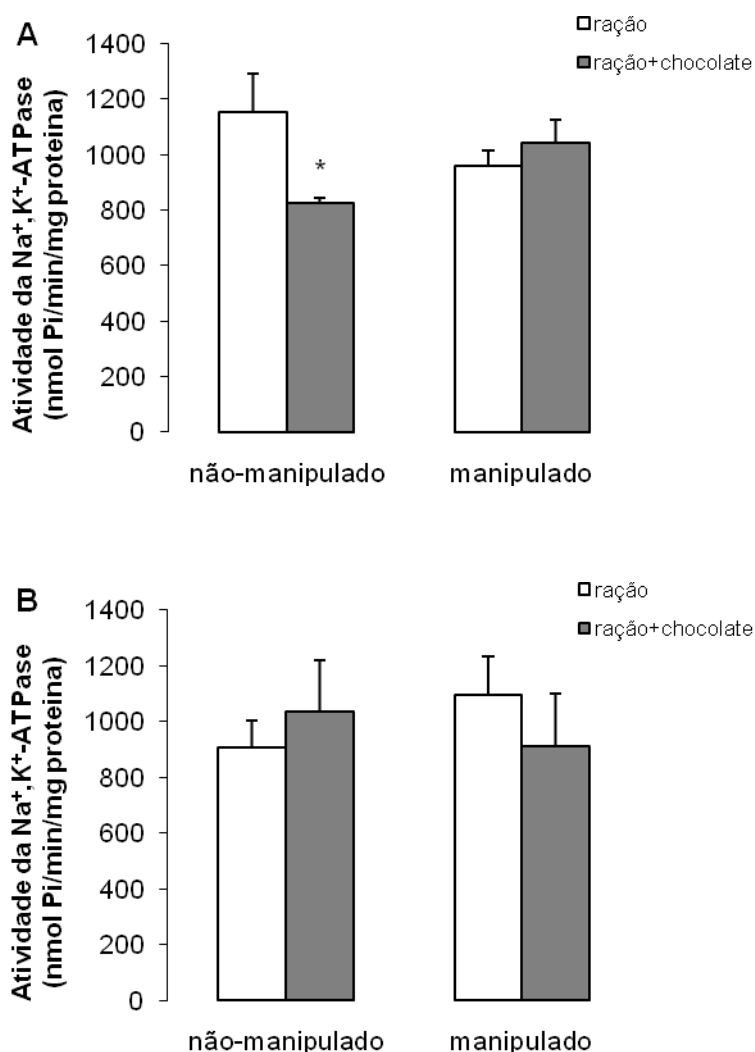


Figura 3: Atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase na amígdala após exposição crônica ao chocolate e após abstinência da dieta em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após exposição crônica ao chocolate. $N= 4$ ratas/grupo. Uma interação entre grupo x dieta mostrou que o consumo de chocolate reduziu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase na amígdala de ratas não-manipuladas (ANOVA de duas vias, $P=0,033$). * Significativamente diferente do grupo não-manipulado que recebeu somente ração-padrão (teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após o período de abstinência de chocolate. $N= 5$ ratas/grupo. Após 30 dias de privação de chocolate, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase não diferiu entre os grupos (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

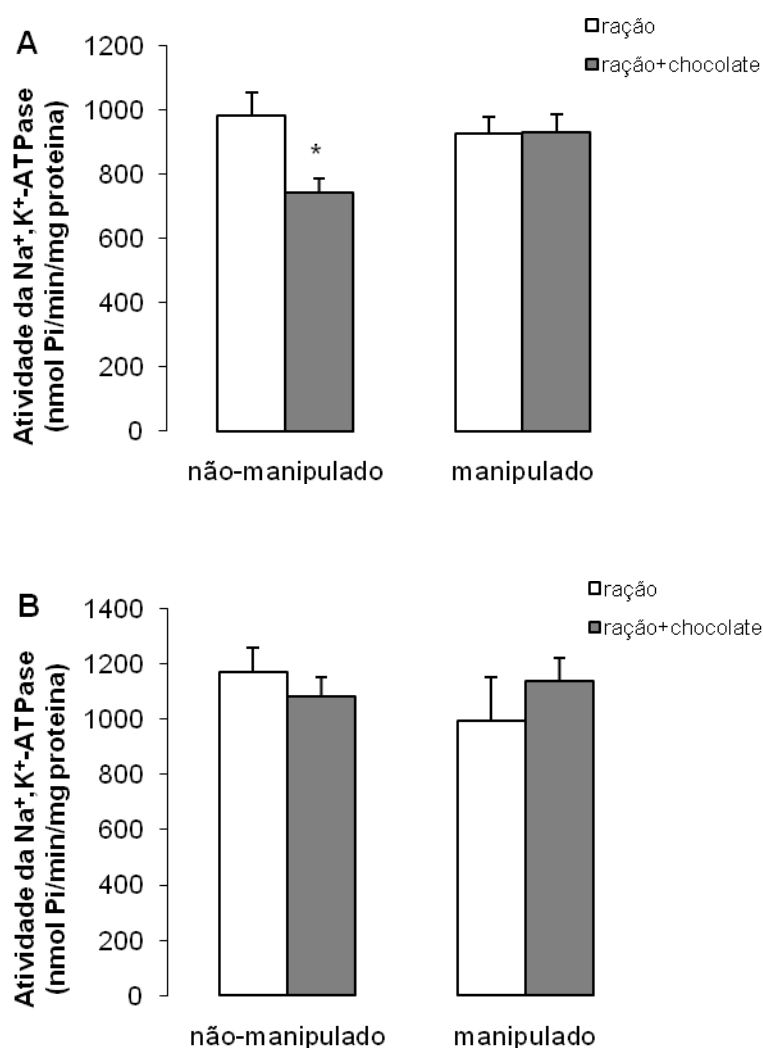


Figura 4: Atividade hipocampal da Na^+, K^+ -ATPase após exposição crônica ao chocolate e após abstinência da dieta em ratas fêmeas adultas manipuladas e não-manipuladas. (A) Média \pm E.P.M da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após exposição crônica ao chocolate. $N= 4$ ratas/grupo. O consumo de chocolate diminuiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo de ratas não-manipuladas (ANOVA de duas vias, interação entre grupo x dieta, $P=0,047$). * Significativamente diferente de todos os outros grupos (teste post-hoc de Duncan, $P= 0,05$). (B) Média \pm E.P.M da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após abstinência o período de abstinência de chocolate. $N= 5$ ratas/grupo. Nenhuma diferença foi observada na atividade da Na^+, K^+ -ATPase entre os grupos, após o período de 30 dias de privação de chocolate (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para manipulação e dieta).

7.3 SEÇÃO III – EXPERIMENTOS ADICIONAIS

O estudo apresentado a seguir é proveniente de um estágio de doutorado no exterior no laboratório do Dr. Michael Meaney (*Developmental Neuroendocrinology Laboratory, Douglas Hospital Research Centre, Departments of Psychiatry, Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Canada*). Esses experimentos adicionais e seus resultados não estão organizados em forma de artigo científico.

Este estudo avaliou a influência das variações naturais do cuidado materno nos primeiros dias de vida sobre o consumo de alimento palatável, peso corporal e parâmetros metabólicos em resposta à exposição crônica a uma dieta rica em gordura na vida adulta.

7.3.1 Materiais e Métodos

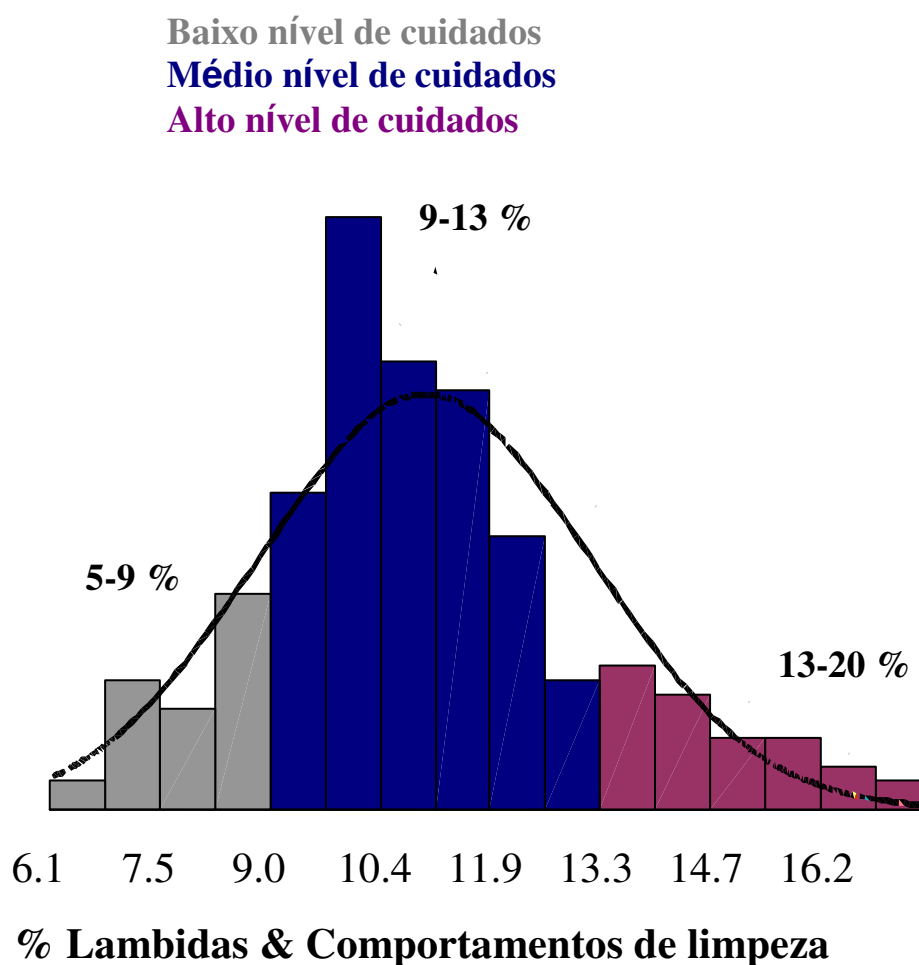
7.3.1.1 Animais Experimentais

Ratas Long-Evans provenientes do Centro de Pesquisas do Hospital Douglas foram mantidas isoladas em caixas-moradia de policarbonato contendo maravalha, num ciclo normal claro/escuro de 12 horas, com ração padronizada e água *ad libitum*. Seus filhotes foram agrupados conforme a intensidade de cuidado maternal durante a infância (ver abaixo). O desmame ocorreu aos 21 dias e então os animais foram agrupados em 2 filhotes da mesma ninhada, sendo utilizados não mais do que dois filhotes de cada ninhada por grupo. Aos 120

dias, machos e fêmeas foram expostos a uma dieta rica em gordura, enquanto um sub-grupo de machos permaneceu recebendo ração padrão *ad libitum* sendo utilizados em um outro experimento. Os procedimentos foram realizados de acordo com os padrões do Conselho Canadense para Estudos Experimentais (*Canadian Council for Animal Care*) e aprovados pelo *McGill University Animal Care Comitee*.

7.3.1.2 Observação dos Cuidados Maternais

O comportamento maternal, de cada genitora, foi observado 5 vezes ao dia (07:00h, 10:00h, 13:00h, 17:00h e 20:00h), nos primeiros 6 dias após o parto, sendo o dia de nascimento considerado como o dia 0 (zero). Para cada período de observação, os seguintes parâmetros de cuidados maternos foram observados, por um período de 112 minutos: a) frequência de lambidas, b) frequência de comportamento de amamentação (dorso arqueado) nos diferentes níveis, c) com ou sem contato com o filhote, d) mãe recolocando os filhotes no ninho e e) ninhada espalhada. Ao desmame, os filhotes foram categorizados conforme a percentagem total do tempo de cuidado da mãe. Conforme o protocolo de categorização da intensidade do cuidado materno; mães com alto nível de cuidado (*High*) são aquelas que demonstram percentagens de tempo no mínimo de 1 desvio-padrão acima da média da coorte inteira, enquanto mães com baixo nível de cuidado (*Low*) são aquelas que demonstram percentagens de tempo no mínimo de 1 desvio-padrão abaixo da média da coorte inteira. O cuidado materno se distribui na população de modo normal, sendo o gráfico de distribuição típico apresentado abaixo:



7.3.1.3 Exposição Crônica à Dieta Rica em Gordura

Aos 120 dias de vida, os animais foram pesados e randomizados em diferentes grupos, sendo colocados em números de 3 a 4 por caixa. Os grupos foram subdivididos em 1) *Low* + ração padrão, 2) *Low* + dieta rica em gordura + ração padrão, 3) *High* + ração padrão e 4) *High* + dieta rica em gordura + ração padrão. Um dia depois, grupos específicos começaram a receber dieta rica em gordura (TD.06415, Harlan Teklad, Wisconsin, USA) *ad libitum* na caixa-moradia. Durante 4 semanas, porções previamente pesadas de alimento rico em gordura

e de ração padrão foram oferecidas, e a quantidade restante foi medida diariamente para avaliar o consumo. O consumo foi medido por caixa e depois dividido pelo número de animais em cada caixa-moradia para obter o consumo médio por rato. O peso corporal foi medido uma vez por semana ao longo do período de exposição crônica à dieta. A Tabela 1 abaixo mostra a composição da dieta rica em gordura:

Tabela 1: Composição dos macronutrientes da dieta.

NUTRIENTES	% kcal
Proteína	19,0
Carboidrato	36,2
Gordura	44,8

Kcal/g = 4,6

7.3.1.4 Coleta de Sangue e Dissecção da Gordura Abdominal

Ao final do período de exposição crônica a dieta rica em gordura foi realizada a coleta de sangue para a determinação dos níveis de glicose e insulina. Os animais foram submetidos a 6 horas de jejum prévio a coleta. Uma solução de glicose a 50% foi injetada intraperitonealmente (2 mL/kg). Através de uma pequena punção na cauda, o sangue foi coletado, em tubos contendo anti-coagulante (EDTA - saturado), no basal, 30 e 120 minutos após a injeção de glicose. Em seguida, o sangue foi centrifugado a frio, o plasma foi separado

e congelado a - 20°C até o dia das análises. Os animais foram mantidos com dieta e ração padrão *ad libitum* por uma semana antes de serem sacrificados.

Os animais foram sacrificados por decapitação sem jejum prévio. As duas maiores porções da gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas e pesadas separadamente, utilizando uma balança de precisão.

7.3.1.5 Medidas Bioquímicas

Os níveis plasmáticos de glicose foram determinados através de um método enzimático utilizando kit comercial (Linco, Missouri, USA) e os níveis de insulina no plasma foram medidos por ELISA também usando um kit comercial (Linco Research, Missouri, USA).

7.3.2 Resultados

7.3.2.1 Consumo de Dieta Rica em Gordura

Durante as primeiras 48 horas de exposição crônica à dieta rica em gordura, filhotes de mães altamente cuidadoras (*high*) consumiram mais alimento rico em gordura (ANOVA de medidas repetidas, efeito do fenótipo, $p= 0,004$; $n= 4$ animais/grupo) quando comparados com

filhotes de mães pouco cuidadoras (*low*). Entretanto, após as primeiras 48 horas até o final do período de exposição crônica à dieta, o consumo não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$).

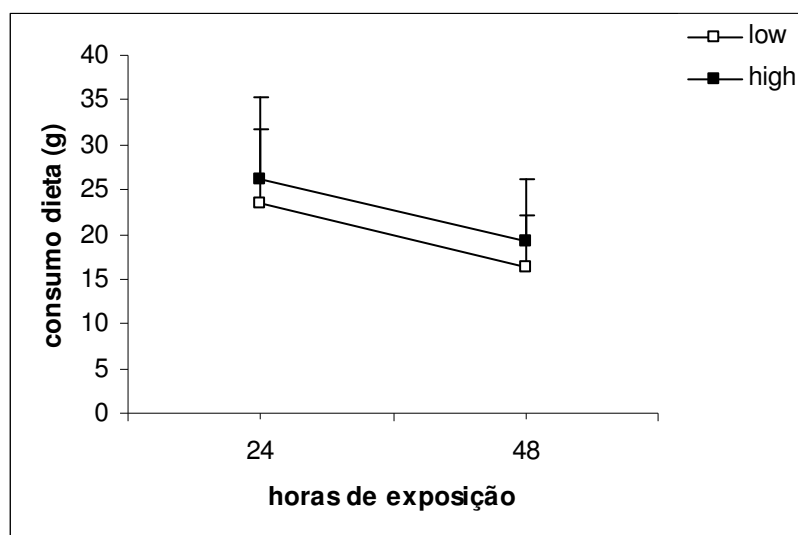


Fig. 1: Consumo nas primeiras 48 horas de exposição ao alimento rico em gordura na caixa-moradia. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Efeito do fenótipo ($p = 0,004$), $n = 4$ animais/grupo.

7.3.2.2 Peso Corporal

Todos os animais aumentaram o peso corporal ao longo das 4 semanas de exposição à dieta (ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $p < 0,001$; machos $n = 6-7$ /grupo, fêmeas $n = 8-10$ /grupo), principalmente os machos (efeito do gênero, $p < 0,001$) e os animais que receberam a dieta rica em gordura (efeito da dieta, $p < 0,001$). Filhotes de mães pouco cuidadoras (*low*) recebendo dieta rica em gordura, demonstraram maiores aumentos no peso

corporal durante o período de exposição à dieta na vida adulta (interação fenótipo x dieta, $p=0,016$).

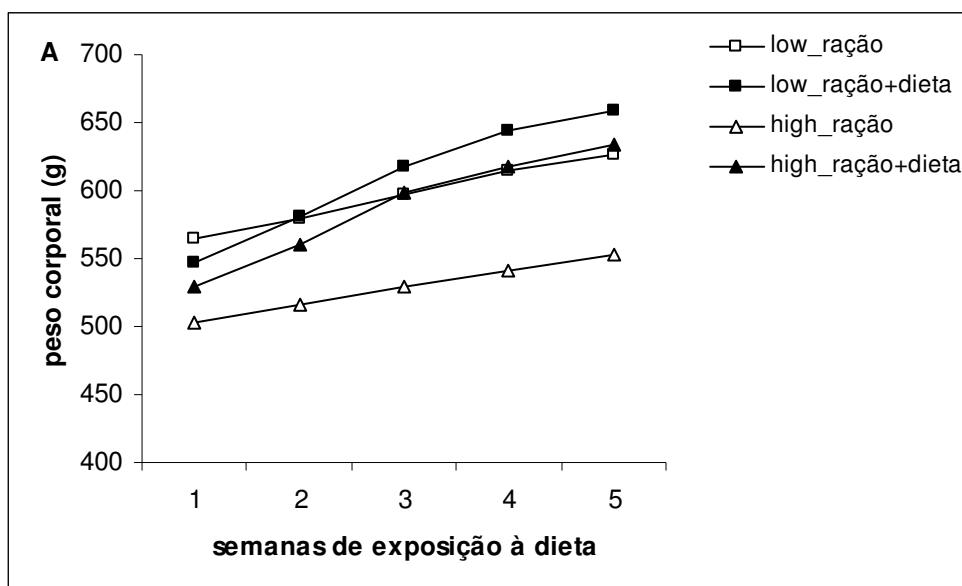


Fig. 2A: Peso corporal durante a exposição crônica à dieta rica em gordura em machos. Os dados são expressos como média do peso corporal. Efeito do tempo, do gênero e da dieta ($p < 0,001$). Interação fenótipo x dieta ($p = 0,016$), $n = 6-7$ /grupo.

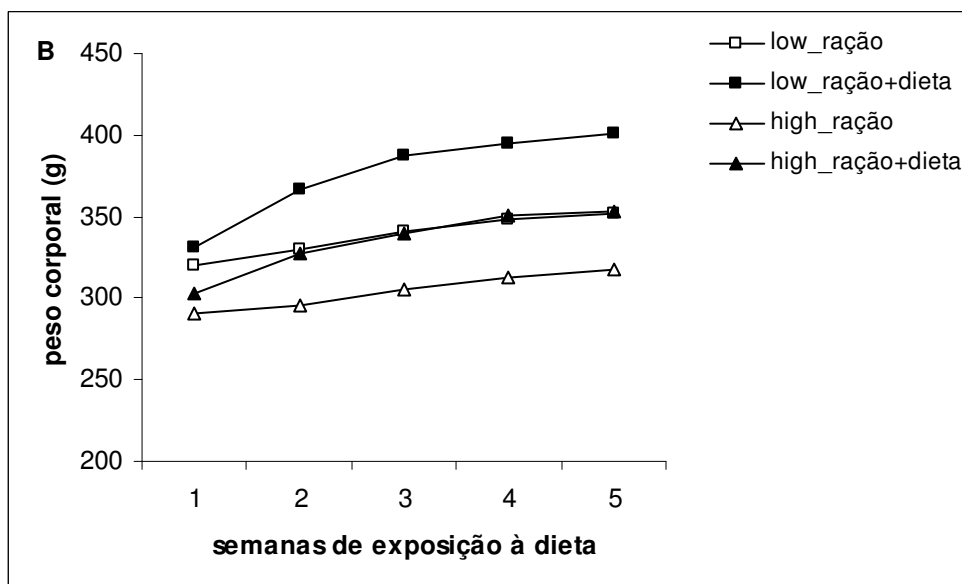


Fig. 2B: Peso corporal durante a exposição crônica à dieta rica em gordura em fêmeas. Os dados são expressos como média do peso corporal. Efeito do tempo, do gênero e da dieta ($p < 0,001$). Interação fenótipo x dieta ($p = 0,016$), $n = 8-10$ /grupo.

7.3.2.3 Ganho de Peso

Machos demonstraram maior ganho de peso corporal (ANOVA de três vias, efeito do gênero, $p < 0,001$; machos $n = 6-7$ /grupo, fêmeas $n = 8-10$ /grupo), assim como os animais expostos cronicamente à dieta rica em gordura (efeito da dieta, $p < 0,001$). Filhotes de mães pouco cuidadoras (*low*) apresentaram maior ganho de peso em comparação com filhotes de mães altamente cuidadora (*high*) após exposição à dieta (efeito do fenótipo, $p = 0,042$). Uma interação entre dieta e gênero foi observada ($p = 0,039$), mostrando que ratos machos recebendo dieta rica em gordura têm um maior ganho de peso ao final do período de exposição crônica.

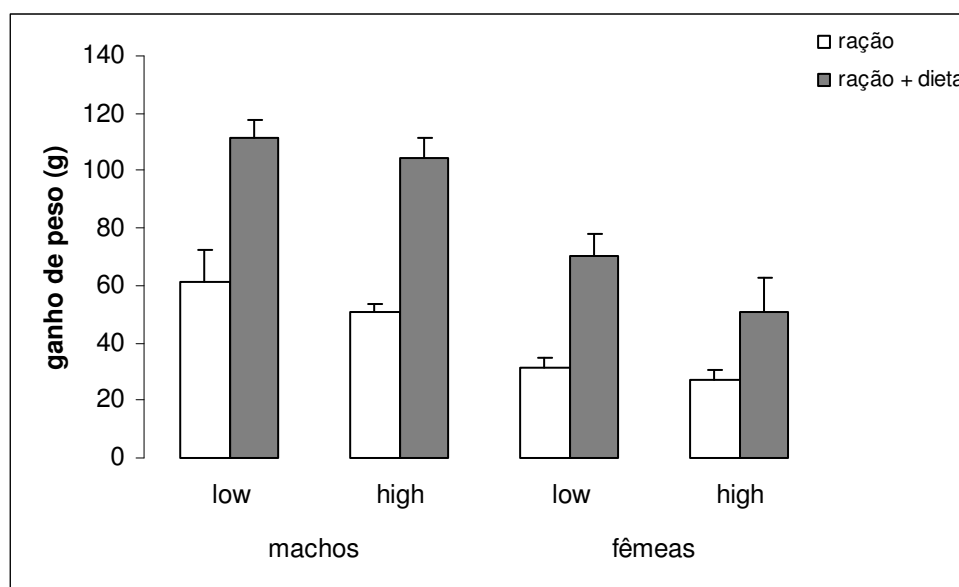


Fig. 3: Ganho de peso após exposição crônica à dieta rica em gordura. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Efeito do gênero e da dieta ($p < 0,001$), efeito do fenótipo ($p = 0,042$) e interação dieta x gênero ($p = 0,039$). Machos $n = 6-7$ /grupo, fêmeas $n = 8-10$ /grupo.

7.3.2.4 Gordura Abdominal

O consumo crônico de dieta rica em gordura induziu um aumento no depósito de gordura abdominal dos animais (ANOVA de três vias, efeito da dieta, $p < 0,001$; machos $n = 6-7$ /grupo, fêmeas $n = 8-10$ /grupo), especialmente em ratas fêmeas (efeito do gênero, $p < 0,001$). Um efeito do fenótipo mostrou que filhotes de mães pouco cuidadoras (*low*) têm maior acúmulo de gordura abdominal quando adultos após exposição crônica à dieta rica em gordura ($p = 0,036$).

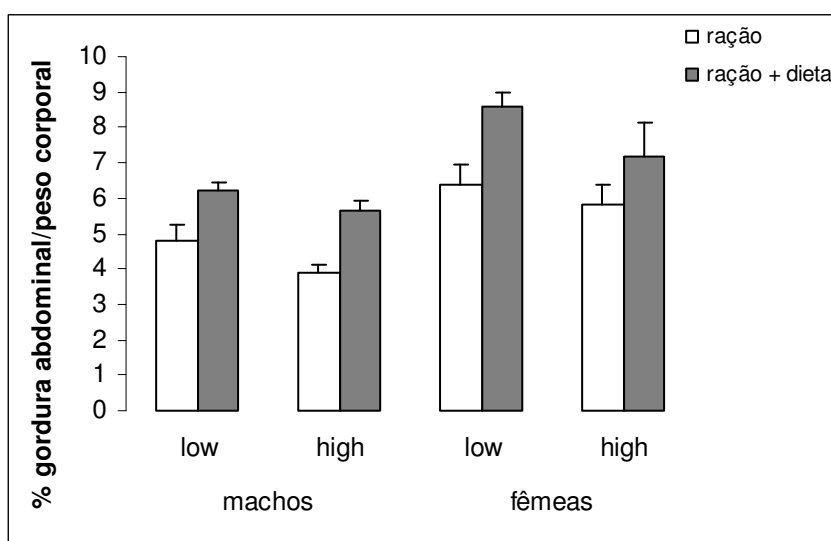


Fig. 4: Relação gordura abdominal/peso corporal após exposição crônica à dieta rica em gordura. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Efeito da dieta e do gênero ($p < 0,001$). Efeito do fenótipo ($p = 0,036$). Machos $n = 6-7$ /grupo, fêmeas $n = 8-10$ /grupo.

7.3.2.5 Medidas Bioquímicas

7.3.2.6 Níveis de Glicose no Plasma

Na medida basal da glicemia, ratos machos demonstraram níveis aumentados de glicose em relação às fêmeas (ANOVA de três vias, efeito do gênero, $p < 0,001$; machos $n = 6-7$ /grupo, fêmeas $n = 8-10$ /grupo). Trinta minutos após a injeção de glicose observou-se efeito do gênero ($p < 0,001$) e da dieta ($p = 0,004$). Níveis aumentados de glicose foram observados em filhotes de mães pouco cuidadoras (*low*) na vida adulta (efeito do fenótipo, $p = 0,014$). Uma interação entre fenótipo e gênero mostrou que ratos machos provenientes de mães pouco cuidadoras (*low*) têm níveis mais elevados de glicose no plasma (interação fenótipo x gênero, $p = 0,015$) em relação aos de mães altamente cuidadoras (*high*). Após 120 minutos da injeção de glicose, ratos machos apresentaram níveis mais altos de glicose no plasma (efeito do gênero, $p < 0,001$).

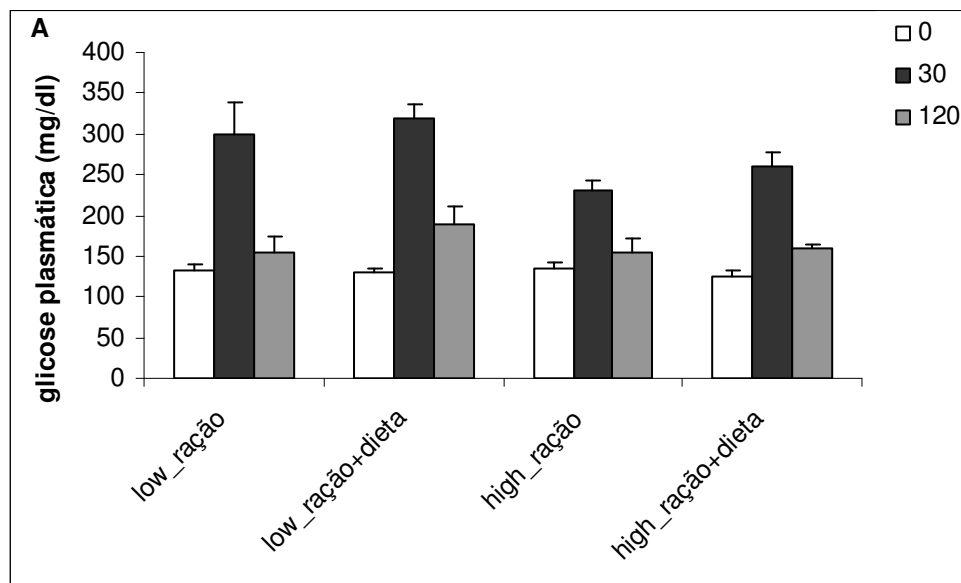


Fig. 5A: Níveis de glicose no plasma após a exposição crônica à dieta rica em gordura em machos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Basal: efeito do gênero ($p < 0,001$). Após 30 min. da injeção de glicose: efeito do gênero ($p < 0,001$), da dieta ($p = 0,004$) e do fenótipo ($p = 0,014$). Interação fenótipo x gênero, ($p = 0,015$), mostrando níveis aumentados de glicose no plasma em ratos machos provenientes de mães pouco cuidadoras (*low*). 120 min. após injeção de glicose: efeito do gênero ($p < 0,001$); $n = 6-7$ /grupo.

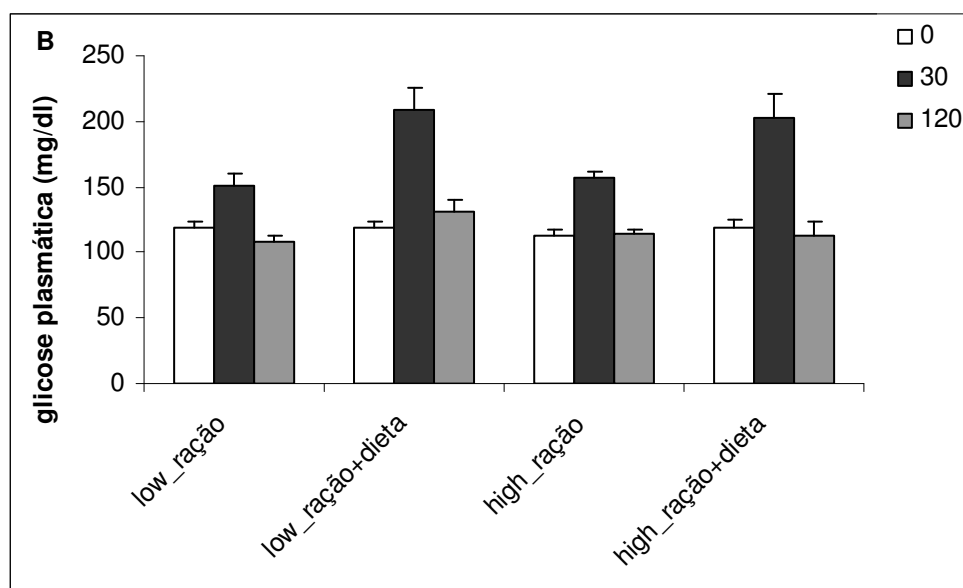


Fig. 5B: Níveis de glicose no plasma após a exposição crônica à dieta rica em gordura em fêmeas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Basal: efeito do gênero ($p < 0,001$). Após 30 min. da injeção de glicose: efeito do gênero ($p < 0,001$), da dieta ($p = 0,004$) e do fenótipo ($p = 0,014$). Interação fenótipo x gênero, ($p = 0,015$), mostrando níveis aumentados de glicose no plasma em ratos machos provenientes de mães pouco cuidadoras (*low*). 120 min. após injeção de glicose: efeito do gênero ($p < 0,001$); $n = 8-10$ /grupo.

7.3.2.7 Níveis Plasmáticos de Insulina

Animais recebendo dieta rica em gordura demonstraram níveis basais aumentados de insulina no plasma (ANOVA de três vias, efeito da dieta, $p < 0,001$; machos $n = 6-7$ /grupo, fêmeas $n = 8-10$ /grupo), assim com ratos machos (efeito do gênero, $p < 0,001$). Uma interação entre dieta e gênero foi observada ($p = 0,014$), mostrando que machos submetidos à dieta rica

em gordura apresentaram níveis mais elevados de insulina basal. Trinta minutos após a injeção de glicose, ratos machos apresentaram níveis aumentados de insulina (efeito do gênero, $p < 0,001$), o consumo da dieta rica em gordura induziu um aumento nos níveis de insulina no plasma ($p < 0,001$) e um efeito do fenótipo ($p = 0,054$) mostrou níveis aumentados de insulina pós-prandial em animais provenientes de mães pouco cuidadoras (*low*) em comparação com os de mães altamente cuidadoras (*high*). Após 120 minutos da injeção de glicose, níveis aumentados de insulina plasmática foram observados em ratos machos (efeito do gênero, $p = 0,011$), nos animais recebendo a dieta rica em gordura (efeito da dieta, $p = 0,008$) e nos que filhos de mães pouco cuidadoras (*low*) (efeito do fenótipo, $p = 0,002$) em relação aos de mães altamente cuidadoras (*high*).

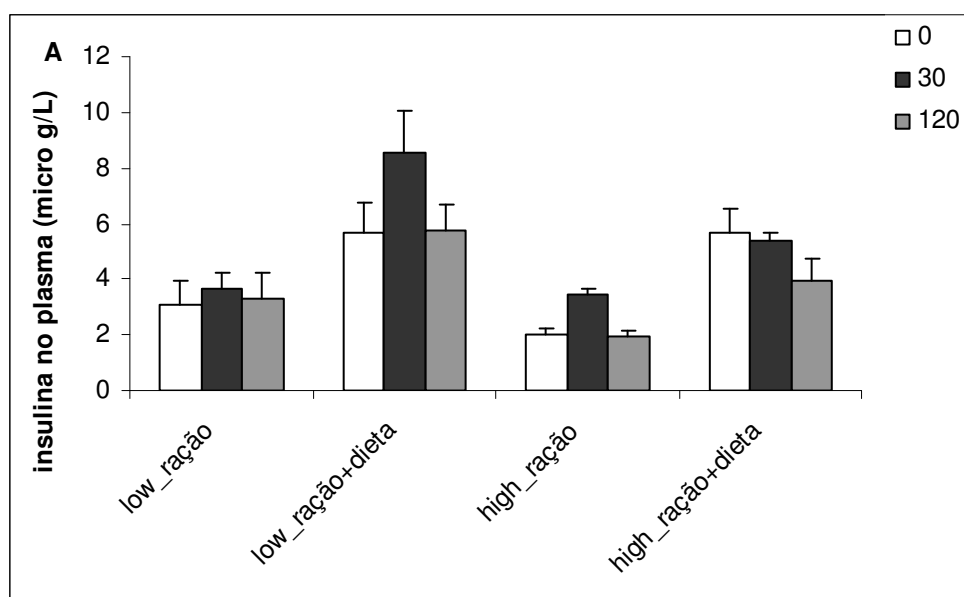


Fig. 6A: Níveis plasmáticos de insulina após exposição cônica à dieta rica em gordura em machos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Basal: Efeito da dieta ($p < 0,001$). Efeito do gênero ($p < 0,001$). Interação dieta x gênero ($p = 0,014$), maiores níveis de insulina basal em machos recebendo a dieta rica em gordura. Após 30 min. da injeção de glicose: efeito do gênero ($p < 0,001$), da dieta ($p < 0,001$) e do fenótipo ($p = 0,054$).

Após 120 min. da injeção de glicose: efeito do gênero ($p= 0,011$), da dieta ($p= 0,008$) e do fenótipo ($p= 0,002$), $n= 6-7$ /grupo.

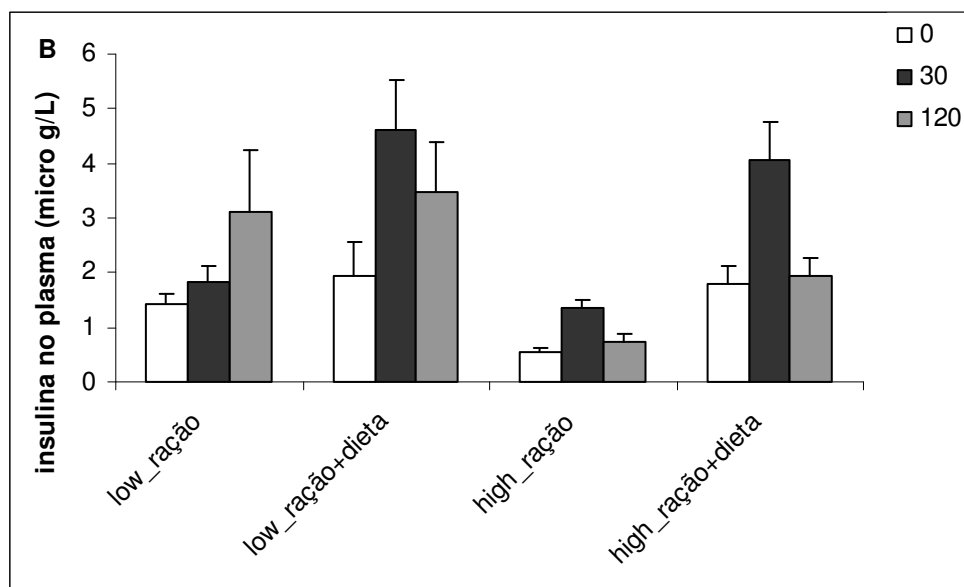


Fig. 6B: Níveis plasmáticos de insulina após exposição cônica à dieta rica em gordura em fêmeas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Basal: Efeito da dieta ($p < 0,001$). Efeito do gênero ($p < 0,001$). Interação dieta x gênero ($p = 0,014$), maiores níveis de insulina basal em machos recebendo a dieta rica em gordura. Após 30 min. da injeção de glicose: efeito do gênero ($p < 0,001$), da dieta ($p < 0,001$) e do fenótipo ($p = 0,054$). Após 120 min. da injeção de glicose: efeito do gênero ($p = 0,011$), da dieta ($p = 0,008$) e do fenótipo ($p = 0,002$), $n = 8-10$ /grupo.

8 DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho, a manipulação neonatal induziu alterações no comportamento alimentar, onde se identifica um maior consumo de alimento palatável quando os animais são expostos por um curto período a esse tipo de alimento. As ratas manipuladas expostas cronicamente à dieta palatável demonstraram uma resposta metabólica diferenciada, sendo protegidas contra o acúmulo de gordura abdominal, o aumento da atividade da butirilcolinesterase e da proteína S100B no soro, como também contra a redução na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em estruturas cerebrais como o hipocampo e a amígdala.

Ratas manipuladas nos primeiros dias de vida exibiram um comportamento alimentar particular na vida adulta, onde se observa um consumo aumentado de alimento palatável quando essas ratas são agudamente expostas ao chocolate. Quando o período de exposição se prolongou por 30 dias, o consumo desse tipo de alimento passou a não diferir entre as ratas manipuladas e não manipuladas. Entretanto, a re-exposição ao chocolate, após uma semana de privação do mesmo, mostrou que as ratas manipuladas são capazes de recuperar sua preferência inata pelo alimento palatável. Está bem estabelecido na literatura que animais manipulados consomem mais alimento palatável quando comparados com ratos não-manipulados (SILVEIRA *et al.*, 2004, DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007). Contudo, os mecanismos envolvidos nesta alteração do comportamento alimentar induzida pela manipulação neonatal necessitam de maiores esclarecimentos. Algumas possibilidades podem ser discutidas: considerando que as ratas manipuladas são capazes de inibir sua preferência inata pelo alimento palatável, reduzindo o consumo durante o período de exposição crônica (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007) e recuperando sua ingestão aumentada de chocolate após um período de privação, poder-se-ia sugerir uma capacidade das ratas manipuladas em lidar

com sua preferência aumentada pelo alimento palatável naturalmente adquirida, de modo a adaptar a quantidade de chocolate consumido à disponibilidade desse tipo de alimento. Outra interpretação baseia-se na descrição de que o balanço entre a insulina e os glicocorticóides é fundamental para a regulação do consumo de alimentos e dos estoques de energia (DALLMAN *et al.*, 2007). Dessa forma, é possível que as ratas manipuladas tenham um balanço diferencial desses hormônios, que as possibilite lidar com uma sobrecarga calórica proveniente de um consumo aumentado de alimento palatável. Isto estaria de acordo com os achados de Boggiano *et al.*, (2007), mostrando que o consumo aumentado de alimento palatável em animais prediz o comportamento do comer compulsivo, independentemente da susceptibilidade à obesidade. No presente estudo, portanto, as ratas manipuladas parecem ser propensas a esse tipo de transtorno no comportamento alimentar, porém isso não estaria relacionado com uma maior vulnerabilidade para o ganho de peso excessivo, possivelmente em razão do diferente balanço hormonal dessas ratas, regulando o consumo e o gasto energético. Adicionalmente, a recuperação da preferência aumentada pelo chocolate nas ratas manipuladas após a privação desse alimento poderia ser explicada por uma maior capacidade dessas ratas de modular o sistema dopaminérgico-mesolímbico, conforme a disponibilidade do alimento palatável. Está descrito que animais manipulados nos primeiros dias de vida pós-natal, quando adultos, têm um metabolismo dopaminérgico diminuído no núcleo acumbens e mostram menos reações hedônicas positivas em resposta ao alimento doce (SILVEIRA *et al.*, 2010). Então, é possível que a recuperação do consumo aumentado de chocolate, após um período curto de privação desse alimento nas ratas manipuladas esteja relacionada com uma tentativa de aumentar a resposta dopaminérgica numa situação de exposição aguda, ou seja, de limitado acesso ao chocolate, o que provavelmente não seria observado durante a exposição crônica ao doce devido à maior e indeterminada disponibilidade desse alimento na caixa moradia.

Observamos também que as ratas manipuladas no período neonatal, cronicamente expostas ao alimento palatável na vida adulta, não demonstraram alterações nos sinais comportamentais de abstinência após as primeiras 24 horas de privação de chocolate, ao contrário das ratas não-manipuladas, que exibiram uma frequência aumentada nos parâmetros de abstinência (tremores de cabeça) em resposta à privação de doce. Considerando o potencial aditivo conferido ao alimento palatável, por agir sobre o sistema dopaminérgico, produzindo efeitos similares aos de drogas de abuso (AVENA *et al.*, 2008), pode-se sugerir que as ratas manipuladas tenham uma menor responsividade do sistema dopaminérgico-mesolímbico à retirada abrupta do alimento palatável em relação às ratas não-manipuladas. Esta suposição concorda com achados da literatura que mostram um efeito da manipulação neonatal sobre o sistema de recompensa, induzindo uma reduzida responsividade dopaminérgica a drogas de abuso (BRAKE *et al.*; 2004), bem como um diminuído metabolismo dopaminérgico no núcleo acumbens (SILVEIRA *et al.*, 2010). Adicionalmente, é possível que a menor vulnerabilidade das ratas manipuladas à privação do alimento palatável, quando da ausência de sinais comportamentais de abstinência, seja mediada pela diminuída resposta ao estresse, classicamente descrita nesses animais (LEVINE *et al.*, 1967; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a exposição crônica à dieta palatável não alterou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo e na amígdala de ratas manipuladas, enquanto reduziu a atividade da enzima nessas mesmas estruturas cerebrais de ratas não-manipuladas no período neonatal. Esse achado sugere uma menor suscetibilidade das ratas manipuladas aos efeitos do consumo crônico de chocolate, considerando relato prévio de que o cacau inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase *in vitro* (HARLAN, MANN, 1982), além de um provável efeito protetor da manipulação neonatal contra a redução na atividade cerebral da Na^+, K^+ -ATPase induzida pela exposição crônica à dieta palatável. A atividade cerebral da Na^+, K^+ -ATPase está relacionada

com o sistema de recompensa. Por exemplo, há relatos recentes de que a atividade da enzima é modulada por drogas de adição, como por exemplo a morfina (WU *et al.*, 2007) e que prejuízos na função da Na^+, K^+ -ATPase estariam relacionados com dependência e tolerância a opióides (TAYLOR, FLEMING, 2001). Desta forma, levando em consideração o potencial aditivo do alimento palatável (AVENA *et al.*, 2008), é possível que a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase identificada nas fêmeas não-manipuladas esteja relacionada com uma dependência ao alimento palatável nessas ratas.

Outra explicação alternativa para esse efeito da manipulação protegendo contra uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase após o consumo crônico de alimento palatável, inclui a possibilidade da exposição crônica ao chocolate atuar como um evento estressor. Dessa forma, é possível supor que a ausência de efeito da dieta crônica sobre a atividade cerebral da enzima nas ratas manipuladas, possa ser mediada pela resposta diminuída ao estresse, classicamente descrita em animais manipulados nos primeiros dias de vida (LEVINE *et al.*, 1967; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004). Vale a pena ressaltar também que a manipulação neonatal induz modificações persistentes no hipocampo do rato, incluindo aumento nos níveis de neurotrofinas, na proliferação celular, na densidade do RNAm para receptor de glicocorticóides e na expressão gênica desse receptor (O'DONNELL *et al.*, 1994; JUTAPAKDEEGUL *et al.*, 2003; LADD *et al.*, 2004; LEMAIRE *et al.*, 2006; CIRULLI *et al.*, 2007). Essas modificações hipocampais duradouras justificam os efeitos da manipulação neonatal sobre a diminuída responsividade ao estresse nesses animais (LEVINE *et al.*, 1967; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004). No presente estudo, foi observado que as ratas manipuladas foram protegidas contra uma redução na atividade hipocampal da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelo consumo crônico de chocolate. Esse achado nas ratas manipuladas poderia ser explicado pelas alterações neuroquímicas previamente descritas nesses animais, que incluem maior sensibilidade do mecanismo de retro-alimentação negativa dos

glicocorticóides e maior concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo (LEVINE *et al.*, 1967; MEANEY *et al.*, 1989). Dessa forma, essas alterações poderiam induzir uma menor suscetibilidade das ratas manipuladas aos efeitos do consumo crônico de chocolate sobre o hipocampo. Pode-se sugerir também uma regulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase pelos receptores de glicocorticóides, em vista da sua maior concentração no hipocampo de animais manipulados (LEVINE *et al.*, 1967; MEANEY *et al.*, 1989), o que permitiria às ratas manipuladas regularem o metabolismo neuronal, de modo a modificar a vulnerabilidade do neurônio e reduzir os efeitos da dieta palatável sobre a atividade da enzima no hipocampo.

Levando em consideração, a reduzida responsividade ao estresse nos animais manipulados e, por conseguinte, uma menor exposição aos glicocorticóides que modulam a produção de leptina no tecido adiposo (YOSHIDA *et al.*, 1996) tendo assim efeito sobre o estoque de energia, é possível que uma sensibilidade diferenciada do tecido adiposo aos glicocorticóides e, conseqüentemente, alterações nos níveis de leptina e/ou na sua ação central estejam envolvidas na menor vulnerabilidade das ratas manipuladas para o desenvolvimento de obesidade abdominal. Estudo recente demonstrou uma correlação entre obesidade e reduzida atividade da Na^+, K^+ -ATPase no tecido nervoso em animais, de acordo com observações já relatadas em tecido adiposo em humanos (IANNELLO *et al.*, 2007). Esses autores demonstraram uma redução periférica na atividade da enzima, diferentemente do presente estudo que observou uma diminuição central na atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Embora na presente tese a atividade da enzima não tenha sido avaliada no tecido adiposo das ratas não-manipuladas, não se pode descartar a possibilidade de uma atividade reduzida da enzima no tecido dessas ratas, o que concordaria com nosso relato prévio de maior depósito de gordura abdominal em ratas adultas não-manipuladas após exposição crônica ao chocolate (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007). Sendo assim, o acúmulo de gordura abdominal, como

um indicador de obesidade, pode estar relacionado com a redução da atividade central da Na^+, K^+ -ATPase nas ratas não-manipuladas. Novamente, a manipulação neonatal parece ter exercido um papel protetor quando do aumento atenuado da gordura abdominal nas ratas expostas ao chocolate crônico. Outro ponto a ser considerado é o elevado consumo de ATP pela enzima Na^+, K^+ -ATPase para manter o potencial de membrana (ERECIŃSKA, SILVER, 1994); por esta razão a reduzida atividade da Na^+, K^+ -ATPase identificada nas ratas não-manipuladas poderia estar influenciando o gasto energético das ratas. Uma ação periférica proveniente do tecido adiposo, inibindo a atividade central da Na^+, K^+ -ATPase e induzindo um desequilíbrio no gasto energético poderia ser uma explicação alternativa para a reduzida atividade da enzima nas ratas não-manipuladas. Além disso, esse desequilíbrio no gasto de energia poderia contribuir para o acúmulo de gordura abdominal demonstrado nas ratas não-manipuladas cronicamente expostas ao alimento palatável, resultando em um processo “vicioso” de pró-alimentação. Evidências de quantidade alterada da enzima nas membranas sinápticas ou de mudanças na sua eficiência, induzidas por processos oxidativos (JAMME *et al.*, 1995; RAUCHOVÁ *et al.*, 1999; ZARROS *et al.*, 2008) poderiam explicar as alterações na atividade da Na^+, K^+ -ATPase nas estruturas cerebrais (hipocampo e amígdala) avaliadas no presente estudo.

A atividade cerebral da Na^+, K^+ -ATPase, como também os níveis da proteína S100B no plasma, podem estar relacionados ao efeito protetor da manipulação neonatal contra o aumento no depósito de gordura abdominal quando ratas adultas são desafiadas com uma dieta hipercalórica e hiperpalatável. Dados recentes mostram que os níveis da proteína S100B aumentam em decorrência do ganho de peso (HOLTKAMP *et al.*, 2008), esse achado vai de encontro com os achados nos animais não-manipulados do presente estudo, mostrando um aumento nos níveis plasmáticos da proteína S100B após o consumo crônico de chocolate e, por conseguinte, ganho de peso corporal. Embora o ganho de peso seja similar entre ratas

manipuladas e não-manipuladas (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007), os níveis de S100B no plasma das ratas manipuladas não foram alterados pela exposição crônica à dieta palatável, possivelmente devido a uma regulação metabólica diferencial vinculada ao peso corporal nessas ratas. Esta possibilidade de uma regulação metabólica particular nas ratas manipuladas pode ser sustentada pelo atenuado acúmulo de gordura abdominal identificado nessas ratas em comparação com ratas não-manipuladas e é provável que a proteína S100B esteja envolvida nesse achado. Neste mesmo contexto, a ausência de aumento na atividade da butirilcolinesterase no soro poderia estar relacionada com a proteção das ratas manipuladas contra o desenvolvimento de obesidade abdominal, além disso, a maior atividade da enzima nas ratas não-manipuladas, induzida pelo consumo crônico de chocolate está diretamente associada com um aumento nos fatores de risco para síndrome metabólica e doença cardiovascular, incluindo resistência à insulina, dislipidemia e acúmulo de gordura corporal (CALDERON-MARGALIT *et al.*, 2006; VALLE *et al.*, 2006; IWASAKI *et al.*, 2007; RANDELL *et al.*, 2005).

Há evidência recente de que a S100B, anteriormente descrita por ser uma proteína originada especificamente no sistema nervoso central, é produzida em diversos tecidos não-cerebrais, incluindo o tecido adiposo (STEINER *et al.*, 2007). No presente estudo, os níveis aumentados de S100B no plasma das ratas não-manipuladas cronicamente expostas ao chocolate parecem ter uma origem central, visto que a concentração dessa proteína na gordura abdominal não foi diferente entre os dois grupos experimentais e que os níveis de S100B podem ser influenciados pela dieta (ZIEGLER *et al.*, 2004). Apesar do consumo crônico de chocolate induzir um aumento do dano ao DNA em estruturas cerebrais (KROLOW *et al.*, 2010) e que alterações no SNC influenciam os níveis de S100B provenientes do SNC (SAVOLA *et al.*, 2004; BERGER *et al.*, 2005; KLEINDIENST *et al.*, 2007; GU *et al.*, 2007), deve-se considerar a possibilidade de uma diferença na taxa de liberação da proteína S100B

pelo tecido adiposo, já que as ratas não-manipuladas expostas ao alimento palatável exibem um maior depósito de gordura abdominal (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007). Está descrito que um ambiente precoce estressor induz um aumento nos níveis de S100B em ratas fêmeas adultas (DIEHL *et al.*, 2007), sugerindo que eventos no início da vida podem modular a produção da proteína. Dessa forma, no presente estudo, pode-se conferir um importante papel protetor da manipulação neonatal contra aumentos nos níveis plasmáticos de S100B. Entretanto, considerando o alimento palatável utilizado aqui (chocolate) como um estressor crônico, os níveis aumentados de S100B nas ratas não-manipuladas poderiam ser interpretados como marcadores de estresse. Seguindo esse mesmo raciocínio, o maior acúmulo de gordura abdominal e a atividade aumentada da butirilcolinesterase no soro dessas ratas também atuam como indicadores de dano nas fêmeas não-manipuladas, o que reforçaria o efeito protetor da manipulação neonatal, mediado pela programação da resposta reduzida do eixo HPA ao estresse nos animais manipulados (LEVINE *et al.*, 1967; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004).

A maior perda de peso corporal, identificada nas fêmeas manipuladas em comparação com as não-manipuladas, após as primeiras 24 horas de abstinência de chocolate sugere uma realçada sensibilidade das ratas manipuladas à retirada do chocolate, pois o consumo calórico total não diferiu entre os dois grupos. Há evidências de que a retirada de uma dieta palatável crônica reverte a intolerância à glicose e a hiperinsulinemia, mas não tem efeito sobre a perfusão sanguínea aumentada nas ilhotas pancreáticas (SVENSSON *et al.*, 1996). Isso indicaria que a suscetibilidade diferenciada das ratas manipuladas aos efeitos da dieta poderia induzir uma modulação específica do apetite e do gasto energético, através de sinais hormonais periféricos, como por exemplo a insulina e a leptina. Por outro lado, uma falha na adaptação metabólica devido à ausência do alimento palatável, poderia explicar a maior perda de peso nas ratas manipuladas após 24 horas de abstinência, o que concordaria com relatos de

alterações na taxa metabólica da utilização da glicose (DINIZ *et al.*, 2004) e no estresse oxidativo (DINIZ *et al.*, 2004; MATSUZAWA *et al.*, 2007) induzidos por dietas altamente calóricas. Também é possível que as ratas manipuladas e controles tenham diferenças na expressão gênica de reguladores do apetite e do gasto energético, como UCP-1, Mc4R e CART, que aumentam imediatamente após o consumo de uma dieta hipercalórica (ARCHER *et al.*, 2005).

A reunião dos achados deste estudo sugere que os efeitos persistentes da manipulação neonatal sobre o comportamento alimentar, bem como sobre a resposta metabólica e neuroquímica de ratas fêmeas cronicamente expostas ao alimento palatável na vida adulta, poderiam ser mediados pelo cuidado materno, visto que esse modelo de intervenção do ambiente precoce é conhecido por produzir um aumento nos cuidados da mãe para com seus filhotes nos primeiros dias de vida (BRANCHI *et al.*, 2001; PRYCE *et al.*, 2001; GAROFLOS *et al.*, 2008). A simples variação natural do cuidado materno, sem qualquer manipulação dos filhotes, tem efeitos sobre a resposta comportamental e neuroendócrina ao estresse (LIU *et al.*, 1997; CIRULLI *et al.*, 2003; CAMERON *et al.*, 2005) semelhantes aos observados em animais manipulados nos primeiros dias pós-natal (LEVINE *et al.*, 1967; ADER, GROTA, 1969; PADOIN *et al.*, 2001; PANAGIOTAROPOULOS *et al.*, 2004). Alterações do comportamento alimentar, onde se observa um consumo aumentado de alimentos palatáveis, são descritas igualmente em animais manipulados (SILVEIRA *et al.*, 2004; DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007) e na prole adulta de mães altamente cuidadoras (Tese de Doutorado de Patrícia Pelufo Silveira, 2007) quando comparados com seus respectivos controles. Outro desfecho semelhante inclui níveis diminuídos de grelina no plasma previamente descritos em animais manipulados (SILVEIRA *et al.*, 2006) bem como em animais que receberam altos níveis de cuidado materno no período neonatal (Tese de Doutorado de Patrícia Pelufo Silveira, 2007). Os dados (não publicados) dos experimentos

adicionais, incluídos na presente tese, mostraram um maior acúmulo de gordura abdominal, induzido pela exposição crônica à dieta rica em gordura na prole adulta de mães com baixos níveis de cuidado materno. Esse achado concorda com um relato recente de depósito de gordura abdominal aumentado em animais não-manipulados expostos cronicamente à dieta palatável na vida adulta (DA SILVA BENETTI *et al.*, 2007).

9 CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo mostrou que o ambiente precoce determina alterações persistentes no comportamento alimentar assim como pode influenciar alterações periféricas e centrais induzidas pela exposição crônica a uma dieta palatável na idade adulta, modulando a resposta metabólica de modo a, no caso da presente intervenção, reduzir a vulnerabilidade de dano metabólico e até mesmo de dano neural, em animais manipulados no período neonatal.

Considerando uma possível translação para humanos desses achados em animais, pode-se sugerir que eventos precoces afetam de forma persistente o comportamento alimentar e o metabolismo de indivíduos adultos (BARBIERI *et al.*, 2009; CRANE *et al.*, 2009).

Levando em conta o contexto atual de elevada prevalência de obesidade e de farta disponibilidade de alimentos palatáveis, é de grande valia o conhecimento de que experiências no início da vida podem determinar a vulnerabilidade e a resistência do indivíduo aos desafios nutricionais na vida adulta, em especial no incentivo à busca de novas perspectivas nas áreas de prevenção e tratamento de transtornos relacionados ao comportamento alimentar e de alterações endócrino-metabólicas.