

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

**TABAGISMO MATERNO DURANTE A GESTAÇÃO E
REAÇÕES FACIAIS HEDÔNICAS AO GOSTO DOCE
EM RECÉM-NASCIDOS**

TESE DE DOUTORADO

CAROLINE AYRES

Porto Alegre, Brasil

2015

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

**TABAGISMO MATERNO DURANTE A GESTAÇÃO E
REAÇÕES FACIAIS HEDÔNICAS AO GOSTO DOCE
EM RECÉM-NASCIDOS**

CAROLINE AYRES

Orientador: Marcelo Zubaran Goldani

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 Doutora.

Porto Alegre, Brasil

2015

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:

25/09/2015

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Marco Antonio Barbieri

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Roberto Ferrari Mosca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Júlia Ayres Nuske, minha filha amada e querida. Dedico também a todas as mães que permitiram que esta pesquisa fosse concretizada.

AGRADECIMENTOS

À minha filha Júlia Ayres Nuske, por todo seu amor e pelo companheirismo na coleta de dados da pesquisa.

Aos meus pais, Angel (in memorian) e Marivanda, ao meu irmão, Eduardo, e a minha avó, Manoela, por todo o amor dedicado ao longo da minha vida, compreensão nos momentos de dificuldade e estresse.

Ao Maurício, meu amor, por seus conselhos, compreensão e paciência nos momentos de estresse.

Ao Professor Humberto Rosa, por ter me incentivado a percorrer o caminho da pesquisa, e por ter me apresentado o Professor Marcelo Goldani.

Ao Professor Marcelo Goldani, pela orientação, por me ensinar sobre pesquisa, por ser meu mestre nesta área tão linda que é a saúde da criança e do adolescente, por me transformar em uma profissional crítica em relação ao conhecimento, pela oportunidade, paciência, sabedoria e ensinamentos fundamentais no início da minha carreira como nutricionista, há 11 anos, no ambulatório que foi pioneiro em seguimento de pré-termos do Hospital de Clínicas.

À Juliana Bernardi por toda a parceria, pela amizade, alegria e ajuda nesta fase tão importante.

Ao Charles Ferreira, por carregar as energias, pela amizade, ajuda e obrigada por me ensinar um pouquinho de Neurociências.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Rosane Blanguer, por sua paciência e disponibilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação, oportunidade única e especial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) devido ao apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Hospital Conceição, incluindo os funcionários do Alojamento Conjunto, por todo o entusiasmo, curiosidade e parceria.

A todas as mães e seus bebês, por terem aceitado participar desta pesquisa e com isso proporcionar a construção desta tese.

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse estudo é verificar se a exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina está relacionada a um padrão específico de expressões faciais hedônicas para o gosto doce em recém-nascidos, no início da vida. **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal, controlado e observacional. Foram avaliados recém-nascidos saudáveis, com até 24 horas de vida. Para compor a amostra foram incluídos recém-nascidos de nascimento único, idade gestacional acima de 37 semanas, nascidos de parto normal, em aleitamento materno exclusivo e cujos recém-nascidos já haviam sido colocados ao seio materno previamente ao teste de reação facial hedônica resultante do gosto doce. A amostra é de conveniência e foi selecionada de forma consecutiva, de acordo com a exposição ou não ao tabaco na vida intrauterina, até atingir o número de recém-nascidos necessários para o estudo. Neste estudo, dividimos os recém-nascidos estudados em dois grupos: a) Recém-nascidos expostos ao tabagismo materno na vida uterina (n=50); b) Recém-nascidos não expostos ao tabagismo materno na vida uterina (n=150). Para comparar as expressões faciais hedônicas à sacarose em relação à exposição ou não ao tabagismo materno durante a gestação foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparar os valores extremos das expressões faciais hedônicas a sacarose entre os grupos foi aplicado o teste de *Moses*. Para controle de fatores confundidores como, peso ao nascimento, comprimento ao nascimento, duração da gestação, escolaridade, razão de crescimento fetal e tempo da última mamada até a hora do teste foi utilizada a Análise de Covariância (ANCOVA). **Resultados:** A frequência total de reações faciais hedônicas a estímulo oral doce em recém-nascidos expostos e não expostos ao tabagismo materno durante a gestação não foi diferente entre os grupos ($p=0,051$), no entanto, verificando os valores extremos, observou-se que o grupo exposto ao tabagismo na gestação apresenta menos valores extremos do que o grupo não exposto, provavelmente devido ao “congelamento” da reação hedônica no grupo exposto ($p<0,001$). **Conclusão:** O tabagismo materno durante a gestação pode estar relacionado a um padrão específico de expressões faciais hedônicas para o sabor doce no início da vida. Não existe diferença estatística entre maior frequência de reações faciais hedônicas a substâncias doces em recém-nascidos expostos ao tabagismo na vida intrauterina, entretanto, observamos que recém-nascidos expostos ao tabagismo na vida intrauterina parecem ter as expressões faciais congeladas/sensibilizadas em relação ao consumo de uma substância doce, uma vez que recém-nascidos não expostos atingem níveis maiores de prazer em relação à ingestão de substância doce. Pode-se propor que o tabagismo materno leva a uma sensibilidade ao prazer provocada pelo sabor doce e, possivelmente, os indivíduos com esta sensibilidade poderiam aumentar o consumo alimentar por doce para tentar chegar a um maior grau de prazer. **Palavras-chave:** DOHaD, programação, tabagismo materno durante a gestação, reações faciais, reações hedônicas em recém-nascidos, gosto.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study is to verify that exposure to maternal smoking during intrauterine life is related to a specific pattern of hedonic facial expressions to the sweet taste in newborns, in early life. **Methods:** This is a cross-sectional study controlled and observational. Healthy newborns were evaluated up to 24 hours of life. For the sample were included newborns single birth, gestational age of 37 weeks, born vaginally, were exclusively breastfed and whose newborn had already been placed in the womb prior to the resulting hedonic facial reaction test sweet taste. The sample is for convenience and is selected consecutively, according to exposure or not tobacco during intrauterine life, until the number of infants needed for the study. In this study, we divided the newborns studied in two groups: a) Newborns exposed to maternal smoking on uterine life (n=50); b) Infants not exposed to maternal smoking on uterine life (n=150). To compare the facial expressions hedonic the sucrose with respect to exposure or not to maternal smoking during pregnancy was performed using the Mann-Whitney test. To compare the extreme values of facial expressions hedonic sucrose was applied between groups Moses test. To control confounding factors such as birth weight, length at birth, length of gestation, education, fetal growth rate and time of the last feeding until the time of testing we used the Analysis of Covariance (ANCOVA). **Results:** The overall frequency of hedonic facial reactions sweet oral stimulation in neonates exposed and not exposed to maternal smoking during pregnancy did not differ between the groups (p=0.051), however, checking the extreme values, it was observed the group exposed to smoking during pregnancy has fewer outliers than the unexposed group, probably due to "freeze" the hedonic reaction in the exposed group (p <0.001). **Conclusion:** Maternal smoking during pregnancy may be related to a specific pattern of hedonic facial expressions to the sweet taste at the beginning of life. There is no statistical difference between higher frequency of hedonic facial reactions to sweet substances in newborns exposed to smoking in intrauterine life, however, we found that newborns exposed to smoking in intrauterine life seem to have facial expressions frozen/sensitized in relation to consumption a sweet substance, since non-exposed neonates soon reach higher levels compared to the sweet substance intake. One can propose that maternal smoking leads to a sensitivity to pleasure caused by sweet taste and possibly individuals with this sensitivity could increase food consumption by sweet to try to reach a greater degree of pleasure.

Keywords: DOHaD, programming, smoking during gestation, hedonic response, hedonic reactivity, facial reactions, taste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Circuito cerebral hedônico	25
Figura 2 – Sequência de protusão rítmica da língua, denominado reações hedônicas	36
Figura 3 – Box-plot da frequência total de expressões hedônicas em relação à água e sacarose em 60 segundos	45
Figura 4 – Box-plot da frequência total de expressões hedônicas em relação à sacarose em 60 segundos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características materna e do recém-nascido.....	44
Tabela 2 – Frequência total e expressão facial hedônica conforme exposição ao tabagismo materno durante a gestação.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS **

ANCOVA - Análise de Covariância

BWR – Razão de Crescimento Fetal

CEP/GHC – Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DP - Desvio padrão

DOHaD - *Developmental origins of health and disease*. Origens Desenvolvimentistas da saúde e da doença.

HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

IMC - Índice de massa corporal

GHC - Grupo Hospitalar Conceição

SUS – Sistema Único de Saúde

N - Número de indivíduos

NPY - Neuropeptídeo Y

NESCA - Núcleo de Estudos em Saúde da Criança e do Adolescente

RCIU - Restrição de Crescimento Intrauterino

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

POMC - Pró-opiomelanocortina

** Algumas siglas foram mantidas na forma original, em inglês, por serem assim conhecidas internacionalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHaD)	15
2.2 EFEITOS DO TABAGISMO MATERNO SOBRE O FETO	16
2.3 GOSTO.....	19
2.4 REAÇÕES FACIAIS AFETIVAS OU REAÇÕES FACIAIS HEDÔNICAS EM RECÉM-NASCIDOS E PRAZER	20
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVOS	29
5 HIPÓTESE	30
6 METODOLOGIA	31
6.1 LOGÍSTICA DA PESQUISA	32
6.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	34
6.3 AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES FACIAIS A ESTÍMULOS DO GOSTO DOCE E ÁGUA PURA	35
6.4 ANÁLISE DOS VÍDEOS	36
6.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO	37
6.5.1 DESFECHO OU VARIÁVEIS DEPENDENTES	37

6.5.2 VARIÁVEL INDEPENDENTE OU PREDITORA	38
6.5.3 COVARIÁVEIS	38
6.6 TAMANHO DA AMOSTRA	40
6.7 TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS.....	41
7 RESULTADOS	43
8 DISCUSSÃO	48
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	72
APÊNDICE B – ACEITE DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA	74
APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO	75
APÊNDICE D - ARTIGO ENVIADO PARA REVISTA	85

1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm demonstrado o impacto de eventos perinatais e pós-natais na saúde do indivíduo a médio e longo prazo (BARKER *et al.*, 1993; BARKER, 1998; BARKER *et al.*, 2002; HALES e BARKER, 2013; PERÄLÄ *et al.*, 2012; PERÄLÄ *et al.*, 2011).

Há evidências que a exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina está associada com maior consumo alimentar de carboidratos em relação às proteínas em adultos jovens (AYRES *et al.*, 2011). A restrição de crescimento intrauterino (RCIU) está relacionada com aumento do consumo alimentar em mulheres (BARBIERI *et al.*, 2009), além de alteração da resposta hedônica em recém-nascidos pré-termos (AYRES *et al.*, 2012).

O tabagismo materno durante a gestação traz uma série de consequências negativas para o feto e após o nascimento, como alterações no crescimento fetal (BERNSTEIN *et al.*, 2000; PRINGLE *et al.*, 2005; VIELWERTH *et al.*, 2006;), no sistema respiratório (BILLAUD e LEMARIE, 2001), no sistema circulatório (BLAKE *et al.*, 2000), no aumento do índice de massa corporal (SUZUKI *et al.*, 2014), no desenvolvimento, como déficit de atenção e desordens de hiperatividade (MELCHIOR *et al.*, 2015), dificuldade para leitura, aprendizagem da matemática e habilidades relacionadas a esses aspectos (BATSTRA *et al.*, 2003), no risco para diabetes (LA MERRILL *et al.*, 2015), no risco para depressão e ansiedade (MOYLAN *et al.*, 2015) e no crescimento, como z-score de altura-para-idade menor entre os adolescentes expostos na vida intrauterina e na infância (MURARO *et al.*, 2014).

A exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina também está associada com sobrepeso e obesidade na infância (MENDEZ *et al.*, 2008; VON KRIES *et al.*, 2000, SUZUKI *et al.*, 2014) e um estudo demonstrou que adultos jovens expostos ao tabaco

materno na vida intrauterina preferem mais carboidratos em detrimento de proteínas (AYRES *et al.*, 2011). O tabagismo materno durante a gestação pode estar associado a um consumo alimentar diferenciado e este consumo pode promover o desfecho sobrepeso/obesidade.

Um dos possíveis mecanismos que o tabagismo materno poderia modificar as escolhas alimentares de um indivíduo é a programação da sensibilidade à sinalização hedônica associado com a ingestão de um alimento palatável, o impacto hedônico a este tipo de gosto.

Não existem estudos que tenham avaliado a associação do tabagismo materno durante a gestação e impacto hedônico ao doce em recém-nascidos. Um estudo avaliou as reações hedônicas em recém-nascidos de muito baixo peso e demonstrou uma correlação positiva entre reação hedônica a substância doce e restrição de crescimento intrauterina, ou seja, quanto maior grau de restrição de crescimento intrauterino, menor a frequência de expressões faciais após a oferta de sacarose (AYRES *et al.*, 2012).

Logo, esta pesquisa é relevante uma vez que se propõe a verificar se o tabagismo materno durante a gestação está relacionado a um padrão alterado de expressões faciais hedônicas para o gosto doce no início da vida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHaD)

O conceito DOHaD se baseia na hipótese que fatores ambientais, maternos, de crescimento e desenvolvimento fetal/infantil atuando no início da vida (no momento da concepção, e/ou durante a vida fetal, infância e primeira infância) têm efeitos profundos sobre a vulnerabilidade a doenças mais tarde na vida (GLUCKMAN *et al.*, 2010).

Os estudos nesta área do DOHaD iniciaram-se com as observações epidemiológicas de Barker e colaboradores, que associaram o baixo peso ao nascer com maior risco cardiovascular na vida adulta (BARKER, 1998). Estas observações levaram a uma hipótese de que a desnutrição durante a gestação foi uma importante origem de doenças cardíacas e metabólicas em adultos, devido à programação fetal que modifica estrutura, função e metabolismo do organismo e contribuiu para o surgimento de doença na vida adulta (WADHWA *et al.*, 2009).

Os pesquisadores Barker e colaboradores verificaram que a resposta metabólica imediata do feto à desnutrição é o catabolismo, o que potencializa sua habilidade em sobreviver através da redução do uso de substratos e diminuição da taxa metabólica (BARKER, 1998). O feto adapta-se à desnutrição através de alterações metabólicas, redistribuição do fluxo sanguíneo e, se adaptando, na produção de hormônios tanto fetais quanto na placenta, influenciando o crescimento (BARKER, 1998).

Pesquisadores demonstram que o baixo peso ao nascer está relacionado com aterosclerose (VALENTE *et al.*, 2015), com maior possibilidade de desenvolver diabetes tipo II (ZIMMERMANN *et al.*, 2015) e maior risco para sobrepeso na infância (ONG *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que efeitos a longo prazo em indivíduos submetidos à desnutrição intrauterina no primeiro trimestre da gestação não necessariamente são acompanhados por baixo peso ao nascer (KANNISTO *et al.*, 1997; ROSEBOOM *et al.*, 2001).

Neste contexto, é conhecido que eventos perinatais podem afetar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que está relacionado à resposta ao estresse por meio da secreção de hormônios glicocorticóides. Por exemplo, o crescimento fetal está relacionado à modulação da resposta ao estresse em crianças, embora não se saiba exatamente a medida desta influência (JONES *et al.*, 2006). A exposição à fumaça do tabaco na vida intrauterina também pode afetar a atividade do eixo HPA (GRANGER *et al.*, 2007).

2.2 EFEITOS DO TABAGISMO MATERNO SOBRE O FETO

O tabagismo durante a gestação representa um ambiente intrauterino adverso e é considerado como um insulto que ocorre em um período crítico do desenvolvimento e possivelmente contribua com a suscetibilidade do indivíduo a determinadas condições patológicas ao longo da vida. Estudos demonstram associação entre a exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina com o sobrepeso na infância (OKEN *et al.*, 2005; VON KRIES *et al.*, 2000). A exposição ao tabaco durante a vida intrauterina se associa ao baixo peso ao nascer (HORTA *et al.*, 1997; BERNSTEIN *et al.*, 2000; VIELWERTH *et al.*, 2007; BEYERLEIN *et al.*, 2011), porém alguns pesquisadores sugerem que o sobrepeso associado à exposição do feto ao tabagismo materno durante a gestação é independente da restrição de crescimento intrauterino, podendo ser atribuído a efeitos específicos do cigarro (WIDEROE *et al.*, 2003).

Há evidências, tanto em estudos com animais e humanos, que a exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina pode alterar mediadores periféricos e centrais envolvidas na regulação do apetite e da energia (CHEN e MORRIS, 2007).

Uma pesquisa avaliou a associação entre tabagismo dos pais durante a gestação e risco de diabetes *mellitus* nos filhos. O tabagismo materno durante a gestação foi associado com o diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2. Ter pais que fumaram durante a vida intrauterina também foi associado com um risco aumentado para diabetes *mellitus* entre filhas adultas, independente dos fatores de riscos conhecidos (LA MERRILL *et al.*, 2015).

Um estudo com adolescentes expostos ao tabagismo materno na vida intrauterina avaliou se a exposição estava associada com a ingestão aumentada de gordura e risco de obesidade, e se essas associações podem estar relacionadas a variações das estruturais em regiões do cérebro envolvidas no processamento de recompensa. No total, 378 adolescentes foram estudados (com idade entre 13 a 19 anos; Tanner estágio 4 e 5 de maturação sexual), metade dos quais foram expostos na vida intrauterina ao tabagismo materno. A ingestão de gordura foi avaliada com um recordatório alimentar de 24 horas. A adiposidade corporal foi medida com a antropometria e a bioimpedância. Volumes de estruturas importantes do cérebro envolvidas no processamento de recompensa, ou seja, a amígdala, núcleo accumbens e córtex orbitofrontal, foram medidas por meio da ressonância magnética. Adolescentes expostos ao tabagismo materno na vida intrauterina apresentaram maior gordura corporal total e maior ingestão de gordura em relação aos não expostos. Adolescentes expostos também exibiram menor volume da amígdala, mas não das outras duas estruturas cerebrais. Em consonância com o seu possível papel em limitar a ingestão de gordura, o volume da amígdala se correlacionou inversamente com a ingestão de gordura. A exposição na vida intrauterina ao tabagismo materno pode promover a obesidade, aumentando a preferência alimentar para

gordura e este efeito pode ser mediado em parte por variações estruturais na amígdala (HAGHIGHI *et al.*, 2013).

Alguns pesquisadores referiram que a nicotina pode ter um profundo impacto sobre o cérebro do feto em desenvolvimento, através da sua rápida capacidade de passar para a placenta. Em estudo com animais, a nicotina tem sido associada com a expressão anormal do gene hipotalâmico de reguladores de apetite tais como a regulação negativa do neuropeptídeo Y (NPY) e do pró-opiomelanocortina (POMC) no núcleo arqueado do hipotálamo. O tabagismo materno durante a gestação leva a hábitos alimentares pouco saudáveis e outros distúrbios comportamentais nos filhos (CHEN *et al.*, 2012).

Outro estudo associou tabagismo materno durante a gestação com bulimia nos filhos expostos. Foram estudadas 4046 mulheres com idade de 30 anos, nascidas em 1970 e com bulimia. Após o ajuste para possíveis fatores de confusão, o tabagismo materno na vida intrauterina foi associado com bulimia nas filhas expostas aos 30 anos de idade (MONTGOMERY *et al.*, 2005).

Um estudo demonstrou que o tabagismo materno durante a gestação está associado a uma diversidade de metilação no sangue do cordão umbilical (alterações epigenéticas). Foi observada uma associação entre tabagismo materno durante a gestação e menor peso ao nascer potencialmente mediado por metilação (KÜPERS *et al.*, 2015).

Uma pesquisa demonstrou que mães fumantes preferiram uma maior concentração de sacarose em relação àquelas que nunca fumaram. Essa pesquisa estudou crianças de 5-10 anos de idade (n=84) e as suas mães (n=67) e avaliou a preferência para diferentes concentrações de sacarose em água e diferentes concentração de gordura em um pudim (MENNELLA *et al.*, 2012).

2.3 GOSTO

Os dados disponíveis sugerem que as crianças nascem preferindo gostos que sinalizam nutrientes benéficos (por exemplo, gostos doces sinalizam calorias) e rejeitam gostos que sinalizam compostos nocivos (por exemplo, gostos amargos sinalizam veneno) (SCOTT, 1992).

As sensações de gosto resultam da ativação do sistema gustativo e estão limitadas a identificar basicamente cinco tipos de gostos, como: doce, amargo, azedo, salgado e umami. No entanto, existem evidências para sensação do gosto gordura (MATTESS, 2009; BRADLEY e STERN, 1967). O gosto umami é bem popular no oriente, entretanto tem se popularizado no ocidente. Umami é um termo em japonês que pode ser traduzido como "saboroso" ou "delicioso" (WEILAND *et al.*, 2010; SCHWARTZ *et al.*, 2009). Para identificar um gosto se faz uso de apenas um dos cinco sentidos, o paladar. Assim que o alimento entra em contato com a língua, os receptores presentes na papila gustativa identificam o gosto que ele possui e em seguida enviam a informação para o cérebro. No caso do sabor, a complexidade é um pouco maior, o sabor é descrito como resultado da integração multissensorial do olfato, tato e paladar (WEILAND *et al.*, 2010; SCHWARTZ *et al.*, 2009).

Gosto e sabor são geralmente considerados sinônimos, mas não são. Cada um tem particularidades e funções diferentes. Diferentes odores estimulam o sistema olfativo para criar sensações olfativas. O sabor é o resultado da percepção e integração do gosto com o sistema sensorial através do cheiro: a combinação de odores sentidos e gostos detectados por receptores na cavidade oral é o que cria sensações de sabor, tais como baunilha ou morango (LIPCHOCK *et al.*, 2011; VENTURA e WOROBEY, 2013).

O desejo pelo gosto doce abrange todas as idades, e ao longo da evolução, a preferência pelo gosto doce teve papel importante na nutrição, uma vez que esta preferência

pela doçura determinava o comportamento alimentar em direção a alimentos que forneciam energia e nutrientes essenciais (DREWNOWSKI *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, grandes avanços científicos ajudaram a identificar os eventos iniciais ao reconhecimento do gosto doce (YARMOLINSKY *et al.*, 2010) e os mecanismos cerebrais subjacentes à forte resposta de prazer ao gosto doce (FERNSTROM *et al.*, 2012). Receptores de gosto doces são expressos não só na boca, mas também em outras áreas, particularmente no intestino e no pâncreas (MARGOLSKEE *et al.*, 2007; SCLAFANI, 2007).

Antes do nascimento, a capacidade de detectar gostos doces está funcionando e interagindo com os sistemas de controle (MAONE *et al.*, 1990). Os recém-nascidos podem diferenciar diferentes graus de doçura e vão consumir um maior volume de uma solução que tem um gosto doce (MALLER e DESOR, 1973).

2.4 REAÇÕES FACIAIS AFETIVAS OU REAÇÕES FACIAIS HEDÔNICAS EM RECÉM-NASCIDOS E PRAZER

Nos anos 70, Steiner foi pioneiro nos estudos de reatividade afetiva, quando publicou fotos das reações faciais de recém-nascidos evocadas pelos gostos doces, salgados, azedos e amargos, onde estes gostos provocaram padrões específicos de reações faciais (STEINER, 1973; STEINER, 1974). Os estudos mais atuais registram as expressões faciais através de filmagem, o que permite uma avaliação com precisão quanto à frequência das reações hedônicas e aversivas, bem como sua duração. Este método permite diminuir a velocidade do vídeo e avaliar quadro a quadro as reações faciais realizadas (BERRIDGE, 2000; SMITH e BERRIDGE, 2007).

É possível identificar reações hedônicas a estímulos gustativos, em primatas e roedores. Estudos com ratos ou primatas aplicam, por exemplo, o teste de reatividade ao sabor, que tem como metodologia a administração de soluções (neutra, doce, ácida ou outras) em diferentes concentrações e após a filmagem das expressões faciais (BERRIDGE, 2000; STEINER *et al.*, 2001).

O impacto hedônico ao gosto é refletido em reações faciais afetivas ou hedônicas realizadas por bebês (BERRIDGE, 2000), outros primatas (BERRIDGE, 2000; STEINER e GLASER, 1984) e até mesmo em ratos (BERRIDGE, 2000; BRINING *et al.*, 1991).

Em 1982, alguns autores já estudavam a preferência à sacarose ao nascimento sugerindo que a experiência precoce ao consumo de água adoçada mantém a preferência por soluções de sacarose (BEAUCHAMP e MORAN, 1982). Existem evidências, através da análise das expressões faciais numa idade precoce, que as preferências por determinados sabores, em recém-nascidos, podem variar conforme a história gestacional da mãe (CRYSTAL e BERNSTEIN, 1998).

Pesquisadores que utilizaram o método de reatividade ao sabor demonstraram que a sacarose provocou padrões positivos ou hedônicos como, estalar os lábios em sucção, séries rítmicas de protrusão de língua, relaxamento dos músculos do rosto e um sorriso ocasional. O sabor quinino provocou caretas negativas ou aversivas como, retração dos lábios e testa franzida. Azedo, salgado e outros gostos desencadearam vários graus de reações intermédias entre estas observações (BERRIDGE, 2000). Estudos demonstraram que alguns componentes de gosto provocam reações faciais universais entre todos os primatas, como os “gapes” para o amargo ou séries rítmicas de protrusão de língua para o doce (STEINER *et al.*, 2001; BERRIDGE, 2000; SMITH e BERRIDGE, 2007).

O gosto do sal, representado por soluções salinas, provocou respostas faciais neutras em neonatos (BEAUCHAMP *et al.*, 1986; ROSENSTEIN e OSTER, 1988; BEAUCHAMP *et*

al., 1994). No entanto, uma preferência para o gosto sal se desenvolve após 4 meses de idade e continua na infância (BEAUCHAMP *et al.*, 1986).

Sabe-se que as expressões faciais são extraídas por sensações de gosto e este padrão refere somente a qualidade do gosto, não permite medir sua intensidade. A expressão facial é uma reação afetiva do impacto hedônico de um gosto específico (resposta hedônica), refletindo a sensação de prazer. Adicionalmente, um observador, não pode dizer a qualidade sensorial precisa de uma amostra com base na reação facial de uma criança. Por exemplo, um gosto salgado pode extrair uma reação positiva semelhante a um sabor doce. Um gosto azedo, ou mesmo gosto muito salgado, e gosto amargo também podem extrair reações negativas semelhantes (BERRIDGE, 2000). Em contraste, um observador pode fazer uma excelente avaliação sobre se uma criança "gosta" de um gosto baseado na sua expressão facial dependendo se a reação é positiva (hedônica) ou negativa (aversiva), ou seja, a expressão facial infantil parece ser um excelente indicador de impacto hedônico ao gosto (BERRIDGE, 2000; BERRIDGE, 1996; STEINER *et al.*, 2001).

Embora a preferência para as substâncias doces exista no recém-nascido, padrões de experiências com alimentos doces e bebidas durante o desenvolvimento pode modular essa preferência (BEAUCHAMP e MORAN, 1982).

As reações faciais refletem a qualidade afetiva de eventos agradáveis ou desagradáveis que os ativam (BERRIDGE, 2003). A expressão facial de uma criança para um sabor doce é um exemplo de um comportamento de reação afetiva positiva por intermédio do prazer sensorial (STEINER, 1973; STEINER *et al.*, 2001). A criança tem essencialmente dois padrões de expressões faciais para sabores: reação afetiva positiva - hedônica (Figura 2) ou reação afetiva negativa – aversão. O gosto doce do açúcar normalmente extrai padrões afetivos positivos, como lábios em formato de “bico” com sucção e séries rítmicas de movimentos de protusão da língua. Esses são acompanhados por relaxamento dos músculos

da face (STEINER *et al.*, 2001). Em contraste, o gosto amargo do quinina, por exemplo, extrai padrões afetivos negativos, como caretas que envolvem retração dos lábios, agitação das mãos e movimentos da cabeça (BERRIDGE, 2002; BEAUCHAMP e MORAN, 1982).

Por suas propriedades altamente prazerosas (AVENA, 2009; PEPINO e MENNELLA, 2012) o gosto doce tem a capacidade de provocar respostas faciais hedônicas até mesmo antes do nascimento (DAVIS e POTTER, 1946). Os recém-nascidos apresentam mais sucção quando é oferecida uma solução glicosada em comparação com água (TATZER *et al.*, 1985). Poucos dias após o nascimento, as crianças podem detectar soluções doces diluídas e diferenciar os tipos de açúcares (BEAUCHAMP e MORAN, 1982), preferindo mais o açúcar doce da sacarose do que o açúcar com sabor suave da frutose, da glicose e da lactose (BEAUCHAMP e MORAN, 1982). O recém-nascido é capaz de responder a uma intervenção hedônica através de expressões faciais já nas primeiras horas após o nascimento (STEINER, 1973; STEINER 1974). Um estudo observou que recém-nascidos pré-termo, com idade gestacional entre 33 e 40 semanas produziram respostas mais fortes e mais frequentes de sucção quando oferecido um mamilo de látex adoçado com sacarose em comparação com um mamilo de látex sem açúcar (MAONE *et al.*, 1990).

A base neural para prazer sensorial relacionado a alimentos tem sido estudada e, no início de 2000, estudos demonstraram sub-regiões encefálicas hedônicas, os quais são capazes de amplificar as reações afetivas positivas para gosto doce (gostar), em resposta a determinados estímulos neuroquímicos ou neurobiológicos. Esses mecanismos hedônicos são pelo menos parcialmente distintas da circuitaria mesocorticolímbica, circuito que gera incentivo na motivação para comer (querer) (CASTRO e BERRIDGE, 2014).

Evidências atuais sugerem que essas sub-regiões encefálicas hedônicas existem em estruturas cerebrais límbicas, capazes de aumentar o impacto hedônico de recompensas sensoriais naturais, como gosto doce. Estes pontos de acesso são encontrados no núcleo

accumbens (particularmente na concha medial), no núcleo pálido ventral e no núcleo parabraquial (CASTRO e BERRIDGE, 2014). Essa sub-região encefálica hedônica no pálido ventral pode amplificar o impacto hedônico do doce, expresso como um aumento das reações de “gostar” para o gosto da sacarose (CHAO-YI HO e BERRIDGE, 2013).

A reatividade afetiva ao gosto como uma ferramenta para mensurar as funções hedônicas pode ser usada como uma medida objetiva de impacto hedônico ou reações “gostar/prazer” ao gosto palatável, com base na quantificação das reações afetivas orofaciais para diferentes sabores (STEINER *et al.*, 2001).

Estudos sobre a neuroanatomia do prazer referem à existência de estruturas cerebrais que trabalham em rede ativando neurotransmissores que controlam os eventos de prazer, e que compõem o chamado circuito cerebral hedônico (KRINGELBACH e BERRIDGE, 2009). Essas estruturas controlam dois comportamentos distintos: o gostar e o querer.

Alguns mecanismos hedônicos são encontrados nas estruturas cerebrais, núcleo accumbens, pálido ventral, tronco cerebral, hipotálamo. (CARDINAL *et al.*, 2002; EVERITT e ROBBINS, 2005; KRINGELBACH *et al.*, 2003; KRINGELBACH e ROLLS, 2004; BERRIDGE, 1996).

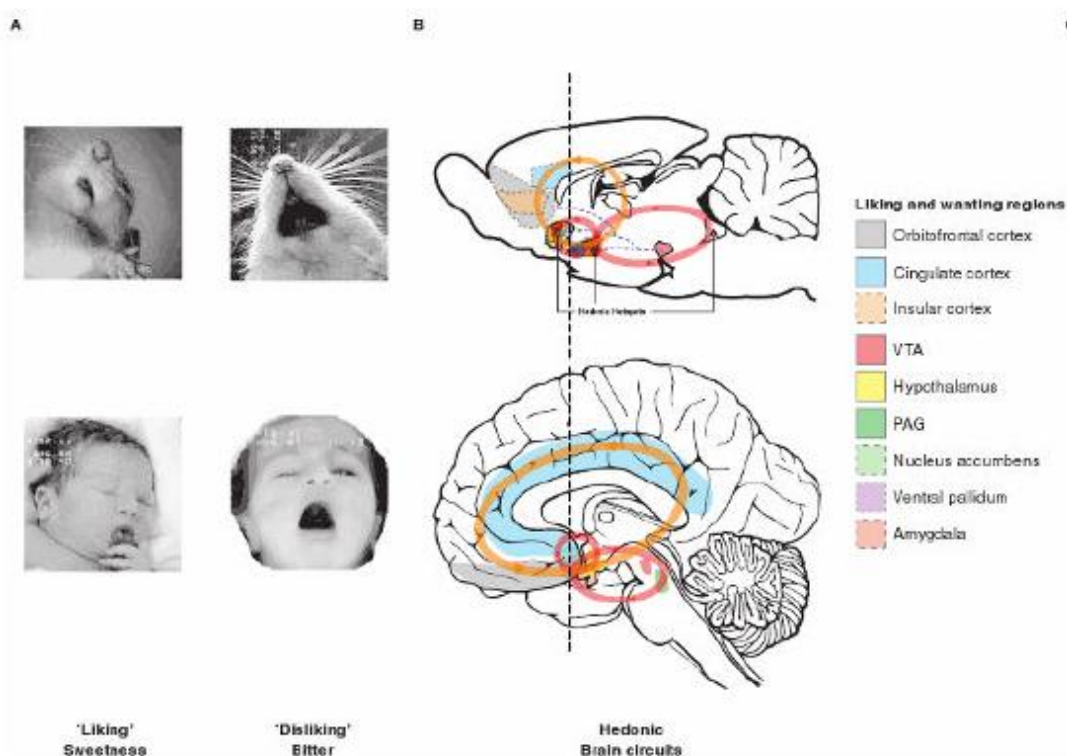


Figura 1: Circuito cerebral hedônico. A figura esquemática mostra as regiões do cérebro relacionadas ao prazer em roedores e seres humanos. (a) expressão facial “positiva – hedônica - gostar” e desencadeada pelo gosto doce e amargo e as respostas as substâncias são semelhantes em roedores e humanos recém-nascidos. (b) hotspots hedônicos relacionados com “o gostar e querer”, onde a ativação neural pode aumentar as expressões faciais para o gosto doce. Esta codificação do prazer no cérebro foram identificados nos seres humanos e roedores. Adaptado: Kringelbach e Berridge, 2009.

O prazer é mediado por circuitos mesolímbicos bem desenvolvidos (Berridge, 2015).

As estruturas envolvidas no circuito cerebral hedônico são: córtex orbitofrontal, córtex do cíngulo, córtex da ínsula, área tegmentar ventral, núcleos hipotalâmicos, substância cinzenta central, núcleo accumbens, núcleo pálido ventral e amígdala (KRINGELBACH E BERRIDGE, 2009).

A capacidade da sensação do prazer nos *hotspot* hedônicos tem sido revelada em parte por estudos em que microinjeções de drogas estimulam receptores neuroquímicos em neurônios dentro dessa região “*hotspot*”, causando uma duplicação ou triplicação do número de reações hedônicas normalmente provocadas por um agradável gosto da sacarose e

moduladores neuroquímicos como os hormônios opióides e endocanabinóides. Esses hormônios são produzidos nas células nervosas do organismo e têm efeito semelhante ao das drogas como ópio ou Cannabis. São estimuladores endógenos de prazer e são produzidos para direcionar nossa atenção específica para as atividades fundamentais para a sobrevivência como buscar e comer alimentos ricos em energia e nutrientes (KRINGELBACH E BERRIDGE, 2009).

A ausência de prazer, anedonia, é um dos sintomas mais importantes de muitas mentais doenças, como por exemplo, a depressão. As regiões necessárias para o prazer do cérebro, mas interrompidas na anedonia, ainda não são claras. Reações aos prazeres sensoriais parecem relativamente difíceis de serem eliminados em animais por uma única lesão cerebral ou drogas. Somente o pálido ventral surgiu entre *hotspots* hedônicos cerebrais como um local onde os danos eliminam a capacidade de reação hedônica positiva em estudos com roedores, substituindo até mesmo “gosto” para doçura com gapes “não gostar” normalmente reservados para o gosto amargo ou semelhantes (CROMWELL E BERRIDGE, 1993).

Importante observar a relação da preferência por alimentos palatáveis na neuroanatomia funcional do prazer. Podemos referir que a preferência alimentar por alimentos palatáveis é regulada por estruturas do circuito cerebral hedônico. Essas estruturas controlam os comportamentos distintos “gostar” e “querer” (CASTRO e BERRIDGE, 2014). É possível “querer” sem “gostar” e esse é exatamente o caso do comportamento de vício. (BERRIDGE, 2007).

Seres humanos que apresentam avidez por ingestão de açúcares e alimentos processados possuem alterações nos centros nervosos e neurotransmissores semelhantes às descritas em dependentes químicos (AVENA *et al.*, 2008).

Um estímulo agradável é frequentemente chamado de estímulo gratificante ou simplesmente uma recompensa (BERRIDGE, 2007).

O gosto e percepção do sabor são fundamentais para o desenvolvimento de preferências alimentares, eles foram apontados como principais impulsionadores de preferências alimentares no início da vida (MENNELLA *et al.*, 2001; MENNELLA *et al.*, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm demonstrado que existe associação entre tabagismo materno durante a gestação e sobrepeso na infância. Um estudo do nosso grupo de pesquisa Núcleo de Estudos em Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) demonstrou que o tabagismo materno está associado a um consumo alimentar maior por carboidratos em detrimento às proteínas, entre os adultos jovens expostos. Até o momento, não existem estudos que tenham avaliado o impacto hedônico do doce na fase neonatal neste grupo de indivíduos. Assim, esta pesquisa se propõe a estudar o impacto hedônico à sacarose em recém-nascido exposto ao tabagismo materno na vida intrauterina e com idade precoce.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo é verificar se a exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina está relacionada a um padrão específico de expressões faciais hedônicas para o gosto doce em recém-nascidos, no início da vida.

Objetivo específico:

1. Comparar a frequência total de reações faciais hedônicas ao gosto doce em recém-nascidos expostos e não expostos ao tabagismo materno durante a vida intrauterina.

5 HIPÓTESE

Esta pesquisa trabalhou com a hipótese de que a exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina altera as respostas hedônicas para o gosto doce (sacarose) em recém-nascidos.

6 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Este é um estudo transversal, observacional controlado, realizado no alojamento conjunto do Hospital Conceição pertencente ao Grupo Hospitalar Conceição (GHC), no período de novembro de 2010 a maio de 2012.

O GHC é referência no atendimento do Sistema Único de Saúde (SUS), e é formado pelos hospitais Conceição, Criança Conceição, Cristo Redentor e Fêmeina, 12 postos de saúde do Serviço de Saúde Comunitária, três centros de Atenção Psicossocial e pelo Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola. Vinculada ao Ministério da Saúde, essa estrutura reconhecida nacionalmente forma a maior rede pública de hospitais do Sul do país, com atendimento 100% SUS. Com uma oferta de 1.564 leitos, é responsável pela internação de 59,9 mil pacientes por ano. Em 2009, o Hospital Conceição e o Hospital Fêmeina fizeram 53% dos partos de Porto Alegre. Dos cerca de 18,5 mil nascimentos anuais em Porto Alegre, quase 9,8 mil ocorreram no Conceição e no Fêmeina, o que significa mais de um nascimento por hora (<http://www.ghc.com.br/default.asp?idMenu=institucional&idSubMenu=1>). (Acesso em: 03 de fevereiro de 2015)

Foram avaliados recém-nascidos saudáveis, com até 24 horas de vida. Para compor a amostra foram incluídos recém-nascidos com nascimento único, idade gestacional acima de 37 semanas, nascidos de parto normal, em aleitamento materno exclusivo e cujos recém-nascidos já haviam sido colocados ao seio materno previamente ao teste da reação facial hedônica. Somente foi realizada a inclusão do recém-nascido no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e esclarecido pela puérpera. A amostra é de conveniência e foi selecionada de forma consecutiva, de acordo com a exposição ou não ao tabaco na vida intrauterina, até atingir o número de recém-nascidos necessários para o estudo.

Foram excluídos os recém-nascidos de puérperas com doenças como: diabetes *mellitus* tipo 1 e 2, hipertensão, vírus da Imunodeficiência Humana – HIV e usuárias de outras drogas.

Os dados maternos e dos recém-nascidos foram coletados do prontuário, Carteira de Pré-natal e Caderneta de Saúde da Criança, e foi realizado teste da reação facial hedônica a estímulos gustativos doces e neutros.

O início da coleta de dados foi executada após a submissão e aceite do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), através do número 10-047.

Neste estudo, dividimos os recém-nascidos estudados em dois grupos:

- a) Recém-nascidos expostos ao tabagismo materno na vida uterina (n=50);
- b) Recém-nascidos não expostos ao tabagismo materno na vida uterina (n=150).

6.1 LOGÍSTICA DA PESQUISA

A coleta de dados foi realizada por uma única pesquisadora, a qual realizou todas as filmagens das reações faciais hedônicas.

A pesquisadora verificava diariamente, através de pesquisas manuais a prontuários no posto de enfermagem do Alojamento Conjunto, os recém-nascidos aptos a participar. Essas pesquisas eram realizadas nos prontuários das puérperas, nos quais forneciam dados do recém-nascido e parto. Com a lista de recém-nascidos, a pesquisadora se direcionava para os quartos do Alojamento Conjunto.

Alguns quartos no Alojamento Conjunto eram compostos por dois (2) leitos e outros por quatro (4) leitos e a coleta de dados foram realizadas neste local. A pesquisadora se

apresentava, informava sobre os objetivos, métodos da pesquisa, entregava uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e lia o mesmo. Com o aceite e assinatura do termo a pesquisadora iniciava a coleta de dados, neste momento a pesquisadora tinha acesso a Carteira de Pré-natal, prontuários e Caderneta de Saúde da Criança. Somente uma puérpera se recusou em participar da pesquisa referindo estar cansada.

Após essa coleta de dados se iniciava o teste da reação hedônica para sacarose e água pura, onde ocorreram as filmagens das expressões faciais.

Primeiramente, foi fornecido para o recém-nascido 1 (um) ml de solução de água deionizada (denominada solução neutra) e então realizada a primeira filmagem com duração de 1 minuto. Na segunda filmagem, também duração de 1 minuto, foi fornecido 1 (um) ml solução de água deionizada com sacarose a 25%.

As soluções foram administradas via oral, pressionando-se levemente o músculo masseter do recém-nascido para que o mesmo abrisse a boca e a substância fosse liberada por uma única pressão do frasco.

A expressão facial do recém-nascido, no momento dos testes, foi registrada através de uma filmagem contínua com duração de 1 (um) minuto, a uma distância de 20 cm entre a câmera e o recém-nascido, sob luz natural, dentro do quarto do hospital, no setor do alojamento conjunto.

A filmadora usada foi a Cyber-Shot DSC-S500, da marca Sony, com 6.0 mega pixels e trinta quadros por segundo. O recém-nascido se encontrava em uma posição confortável, sem chorar e com a puérpera ao seu lado. Após o teste, as puérperas foram orientadas em relação à prática de higiene bucal do recém-nascido, assim como foi realizado o incentivo à prática do aleitamento materno exclusivo, através de explicações sobre a sua importância e seus benefícios para mãe e recém-nascido.

6.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Para caracterizar a substância neutra foi utilizada água deionizada ou purificada e para a substância doce foi utilizada água deionizada com sacarose a 25% (denominada solução doce), onde cada 1ml de solução continha 0,25g de sacarose (Adaptado BERRIDGE, 2000; Adaptado AYRES *et al.*, 2012). As substâncias foram produzidas por uma farmácia de manipulação escolhida pelo padrão de qualidade adotado na preparação das soluções.

A água foi utilizada como um padrão de resposta basal, servindo como controle para o gosto doce (substância neutra) (WEILAND, 2010).

A água deionizada recebeu três processos para total purificação: (1) remoção das sujidades; (2) eliminação das bactérias; (3) eliminação total de micronutrientes. As substâncias eram produzidas diariamente no turno da manhã e entregues no mesmo turno, para que a coleta de dados ocorresse no turno da tarde do mesmo dia. Nesse intervalo eram mantidas sob refrigeração entre 2°C e 8°C. Não foi colocado nenhum tipo de conservante nas soluções, assim as substâncias tinham validade de 24 horas e eram descartadas se não fossem utilizadas neste período.

O acondicionamento das substâncias aconteceu de maneira individual, em um frasco conta gotas, etiquetado com o nome da substância, quantidade (1ml), prazo de validade, lacrado e envolto a um saco plástico também lacrado com seladora. Pesquisadores também utilizaram para as suas pesquisas o estímulo gustativo sendo oferecido através de conta gotas (GANCHROW *et al.*, 1983; ROSENSTEIN e OSTER, 1988).

Todos os frascos foram abertos na presença da puérpera, no momento do teste das reações faciais. As substâncias utilizadas no dia eram acondicionadas em um isopor, dentro de uma bolsa térmica, separadas por tipo de substância.

Através de teste estatístico, foi possível observar que a substância doce (água deionizada com sacarose) resulta no aumento das reações hedônicas em comparação com a substância neutra (água deionizada ou purificada), demonstrado que o impacto hedônico é maior com o gosto doce em relação à água deionizada, desfecho já descrito por outros pesquisadores (STEINER, 1973; STEINER *et al.*, 2001; BERGAMASCO e BERALDO, 1990; MALLER e DESOR, 1973).

6.3 AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES FACIAIS A ESTÍMULOS DO GOSTO DOCE E ÁGUA PURA

A forma utilizada nesta pesquisa para avaliar as reações afetivas a estímulos gustativos foi através de expressões faciais dos recém-nascidos resultantes da ingestão de substância doce e neutra (BERGAMASCO e BERALDO, 1990; STEINER, 2001).

A reação facial afetiva (reação hedônica) foi caracterizada por séries rítmicas de movimentos de protusão da língua (Adaptado BERRIDGE, 2000; STEINER *et al.*, 2001; STEINER, 1973; STEINER, 1974; AYRES *et al.*, 2012; BERGAMASCO e BERALDO, 1990).



Figura 2: Expressão facial hedônica, caracterizada por séries rítmicas de movimentos de protusão da língua. Quatro (4) quadros em sequência após a ingestão de substância doce.

6.4 ANÁLISE DOS VÍDEOS

No total foram analisados quatrocentos (400) vídeos (duzentos vídeos com substância neutra e duzentos vídeos com substância doce), uma vez que foram avaliados duzentos (200) recém-nascidos e cada um recebeu 1 ml de cada substância (neutra e doce).

Os vídeos foram analisados durante 1 minuto na velocidade normal. A análise foi realizada para verificar se ocorreram expressões faciais hedônicas durante 1 minuto de gravação, ou seja, séries rítmicas de movimentos de protusão da língua (Adaptado BERRIDGE, 2000; STEINER, 2001; STEINER, 1973; STEINER, 1974; AYRES *et al.*, 2012).

Posteriormente, as filmagens foram analisadas quadro a quadro, usando o programa Windows Media Player, na velocidade lenta para melhor detectar as expressões faciais hedônicas, com trinta (30) quadros por segundo, totalizando 1800 quadros por 60 segundos.

Foi contabilizada a frequência das reações faciais nos quadros em intervalos de 2 segundos, durante 1 minuto de filmagem contínua. Somente foi considerada a expressão facial que representa uma reação hedônica ou reação afetiva positiva. Para cada expressão facial hedônica era registrada uma frequência. Para fins de análise estatística as frequências foram somadas durante os 60 segundos de filmagem (Adaptado BERRIDGE, 2000; STEINER *et al.*, 2001; AYRES *et al.*, 2012).

Metade dos quatrocentos (400) vídeos (cem vídeos com substância neutra e cem vídeos com substância doce) foram analisados por dois pesquisadores capacitados para essa atividade, cegos para a solução oferecida. Os dois pesquisadores foram treinados por professor que já havia utilizado esta técnica (AYRES *et al.*, 2012).

Foi realizada uma análise prévia para avaliar a concordância entre os dois avaliadores utilizando a análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. O resultado da análise é que os dois pesquisadores são concordantes nas avaliações dos vídeos em relação às expressões faciais com uma mediana e intervalo interquartil de 16 (0-96,75) para o primeiro pesquisador e 15,5 (0-98) para o segundo pesquisador. Após esta análise de concordância positiva, somente um dos pesquisadores seguiu com as avaliações das filmagens.

6.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

6.5.1 DESFECHO OU VARIÁVEIS DEPENDENTES

Foram avaliadas as expressões faciais hedônicas dos recém-nascidos frente à ingestão de uma substância neutra (água) e doce (sacarose) em relação a sua frequência de expressões/reações por quadro. Para este estudo foi utilizado a variável de forma contínua.

6.5.2 VARIÁVEL INDEPENDENTE OU PREDITORA

O dado do tabagismo materno durante a gestação foi utilizado como variável independente. Esta variável foi obtida através da informação materna quanto ao uso de cigarros durante a gestação, sendo codificado como variável categórica, onde classificamos em: fumou em qualquer momento da gestação (coletado a duração e os meses de exposição), não fumou durante a gestação e ex - fumante (fumou alguma vez ou parou de fumar quando soube da gestação). Dentre as Puérperas estudadas não foram encontrados na amostra o terceiro grupo, ou seja, as ex-fumantes, resultando na variável tabagismo materno durante a gestação (sim ou não).

Qualquer quantidade relatada de tabagismo durante a gestação foi considerada como exposição. Foi coletado o número de cigarros consumidos por dia.

A informação sobre consumo de cigarros durante a gestação fornecida pela puérpera durante a visita do pesquisador foi à mesma referida na hora do parto (informação existente no prontuário), fato observado em toda a amostra. Para fins de análises estatísticas a variável foi utilizada na forma categórica dicotômica (sim ou não).

6.5.3 COVARIÁVEIS

- a) Renda Familiar – Esta variável foi utilizada de forma contínua e foi referida pela puérpera na hora da visita do pesquisador. Foi codificada em reais.
- b) Idade materna - Esta variável foi utilizada de forma contínua e foi coletada do prontuário da puérpera. Foi codificada em anos.

- c) Escolaridade materna - Esta variável foi utilizada de forma contínua quanto ao tempo (em anos) de estudo com aprovação. A variável foi coletada no prontuário e foi também referida pela puérpera. Foi codificada em anos de estudo.
- d) Idade Gestacional – Esta variável foi coletada do prontuário do recém-nascido e da puérperas e utilizada de forma contínua. Foi avaliado através da data da última menstruação. Foi codificada em semanas.
- e) Índice de massa corporal (IMC) pré- gravídico - foi calculado dividindo o peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (KEYS *et al.*, 1972). A variável foi utilizada de forma contínua. Foi codificada em Kg/m^2 .
- f) Número de consultas pré-natal – Esta variável foi obtida através da carteira da gestante ou informada pela própria puérperas. Foi utilizada de forma contínua.
- g) Sexo do recém-nascido – Esta variável foi coletada da carteira de nascimento do recém-nascido. Os recém-nascidos foram categorizados por sexo feminino e masculino.
- h) Peso ao nascer do recém-nascido – Esta variável foi coletada da carteira de nascimento do recém-nascido. Foi utilizada na forma contínua e codificada em gramas.
- i) Comprimento ao nascer do recém-nascido – Esta variável foi coletada da carteira de nascimento do recém-nascido. Foi utilizada na forma contínua e codificada em centímetros.
- j) Perímetro cefálico do recém-nascido – Esta variável foi coletada da carteira de nascimento do recém-nascido. Foi utilizada na forma contínua e codificada em centímetros.
- k) Tempo de vida na hora da avaliação – Esta variável foi coletada na hora da filmagem das reações faciais, e foi calculada através da hora de nascimento

subtraída pela hora do teste. Foi utilizada na forma contínua e codificada em horas:minutos.

- l) Tempo da última mamada até a hora do teste: Esta variável foi calculada através da hora da coleta subtraída pela hora da última mamada, em minutos.
- m) Razão de Crescimento Fetal: Esta variável foi utilizada para avaliar ausência ou presença de restrição de crescimento intrauterino. Kramer e colaboradores definiram a severidade da restrição com base na razão de crescimento fetal (BWR), que é constituída pela razão do peso ao nascer observado e a média do peso ao nascer específico para idade gestacional e gênero em uma determinada população. Dessa forma, o grau de restrição pode ser categorizado em $BWR \geq 0,85$ como ausência de restrição; $BWR < 0,85$ e $\geq 0,75$ como restrição moderada e $BWR < 0,75$ como restrição severa (KRAMER *et al.*, 1999). Para este estudo utilizamos a variável de forma contínua e utilizando a definição da $BWR \geq 0,85$ como ausência de restrição.

6.6 TAMANHO DA AMOSTRA

O programa estatístico utilizado para o cálculo amostral foi o WINPEPI, onde foi considerado um nível de significância de 5%, um poder de teste de 80%, uma prevalência de gestantes tabagistas de 25% (KROEFF *et al.*, 2004), uma diferença cujo o tamanho de efeito padronizado seja maior ou igual a 0,5 (0,5 desvios-padrão), totalizando 172 gestantes (43 gestantes tabagistas e 129 gestantes não tabagistas). Acrescentando 10% para as possíveis análises multivariadas, totalizamos 198 gestantes (50 gestantes tabagistas e 148 gestantes não tabagistas).

6.7 TESTES UTILIZADOS

As variáveis estudadas nesta tese foram digitadas duplamente por dois pesquisadores no programa estatístico SPSS versão 18, e após foi realizada análise de frequências das variáveis para comparação e verificação da consistência do banco de dados.

Primeiramente as variáveis foram analisadas em relação a sua distribuição, através do teste Shapiro-Wilk.

As variáveis contínuas simétricas (idade materna, idade gestacional, comprimento do recém-nascido, peso ao nascimento do recém-nascido, perímetro cefálico e idade na hora do teste) foram expressas por média e desvio padrão.

As variáveis contínuas assimétricas (renda familiar, escolaridade materna, frequências das expressões faciais hedônicas a sacarose e frequências das expressões faciais hedônicas a água) foram expressas por mediana e amplitude interquartilica.

A variável categórica (sexo) do recém-nascido foi expressa por frequência absoluta (n) e relativa (%).

Para comparar as variáveis contínuas simétricas basais em relação à exposição ou não ao tabagismo materno durante a gestação foi utilizado o teste estatístico t- *student* e para as variáveis assimétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

A associação entre a variável categórica sexo e tabagismo materno durante a gestação foi avaliada através do teste Qui-quadrado.

Para confirmar se a sacarose tem o poder de evocar reações faciais hedônicas em recém-nascidos foi utilizado o Teste de Wilcoxon.

Para comparar as expressões faciais hedônicas à sacarose em relação à exposição ou não ao tabagismo materno durante a gestação foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para

comparar os valores extremos das expressões faciais hedônicas a sacarose entre os grupos foi aplicado o teste de Moses (Objetivo 1).

Para controle de fatores confundidores como, peso ao nascimento, comprimento ao nascimento, duração da gestação, escolaridade, razão de crescimento fetal e tempo da última mamada até a hora do teste foi utilizada a Análise de Covariância (ANCOVA). Para ser possível a realização desta análise o desfecho foi transformado através de transformação logarítmica.

O nível de significância estabelecido para todas as análises foi de 5%. Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

7 RESULTADOS

Embora os resultados sugiram uma associação entre tabagismo materno e expressões faciais hedônicas à sacarose, não houve significância estatística entre as variáveis ($p=0,051$).

Foram avaliados 200 (duzentos) recém-nascidos que receberam, via oral, uma dose de água e outra de sacarose, totalizando 400 (quatrocentos) vídeos analisados que apresentavam expressões faciais hedônicas originadas da ingestão das substâncias neutra e doce. Desses 200 recém-nascidos, 50 (cinquenta) foram expostos ao tabagismo materno na vida intrauterina e 150 (cento e cinquenta) não foram expostos.

O tempo médio de vida na hora do teste, em horas e minutos, foi de $15:10 \pm 5:51$ para os recém-nascidos não expostos e $14:30 \pm 5:56$ para os expostos. Entre os recém-nascidos expostos ao tabagismo, 46% eram do sexo masculino e 54% eram do sexo feminino, e entre os recém-nascidos não expostos ao tabagismo materno, 46,7% eram do sexo masculino e 53,3% eram do sexo feminino.

A média de idade foi de 23,95 anos para as puérperas não tabagistas durante a gestação e 25,18 anos para as tabagistas.

As puérperas tabagistas apresentaram menor escolaridade que as puérperas não tabagistas ($p=0,001$).

Entre as características dos recém-nascidos, houve diferença estatisticamente significativa entre menor peso ao nascer ($p=0,001$), menor comprimento ao nascer ($p=0,001$) e menor perímetro cefálico ao nascer ($p=0,022$) no grupo exposto ao tabagismo materno durante a vida intrauterina quando comparado ao grupo não exposto. O tempo médio de vida na hora do teste foi de 14:30 para os recém-nascidos expostos e 15:10 para os não expostos. Outras características de cada grupo estão descritas na Tabela 01.

Tabela 1 - Características maternas e do recém-nascido em relação ao tabagismo materno durante a gestação.

Variáveis	Amostra total	Exposição ao tabagismo materno durante a gestação		P
		Não (n=150)	Sim (n=50)	
Renda Familiar (R\$)	190	1000 (510 – 1200)	1000 (600 – 1500)	0,077**
Idade Materna (anos)	200	23,95 ± 6,46	25,18 ± 5,88	0,236*
Escolaridade Materna (em anos)	200	9 (8 – 11)	7,5 (6 – 8)	<0,001**
Idade Gestacional (semanas)	200	39 ± 1,0	39 ± 1,0	0,668*
Sexo do recém-nascido				0,935***
Masculino	93	70 (46,7)	23 (46,0)	
Feminino	107	80 (53,3)	27 (54,0)	
Peso ao nascer do recém-nascido (gramas)	200	3320 ± 403,1	3053,8 ± 445,6	<0,001*
Comprimento do recém-nascido (cm)	200	48,99 ± 1,78	47,92 ± 1,79	<0,001*
Perímetro cefálico do recém-nascido (cm)	199	34,02 ± 1,25	33,55 ± 1,30	0,022*
Razão de Crescimento Fetal ≤ 0.85	200	12 (8,0)	9 (18,0)	0,083***
Tempo de vida na hora do teste (horas:minutos)	200	15:10 ± 5:51	14:30 ± 5:56	0,484*
Tempo da última mamada (min)	200	29 (10 – 60)	43 (10 – 82)	0,279**
IMC pré gestacional (kg/m²)	194	24,0 ± 4,4	22,8 ± 4,5	0,112*
Apgar 1º minuto	200	8,5 ± 0,96	8,5 ± 0,99	0,866*
Apgar 5º minuto	200	9,1 ± 0,50	9,0 ± 0,57	0,269*
Nº de consultas pré-natal	194	7,1 ± 2,6	6,5 ± 2,5	0,137*

Legenda: Dados apresentados como média ± DP, mediana (percentis 25-75) ou n (%). * t de student; ** teste de Mann-Whitney. *** teste qui-quadrado. Os valores totais podem diferir devido a dados faltantes (missing data).

Nesta figura é possível observar que a sacarose provoca mais reações hedônicas $p < 0,001$, quando comparado com a água. Figura 03.

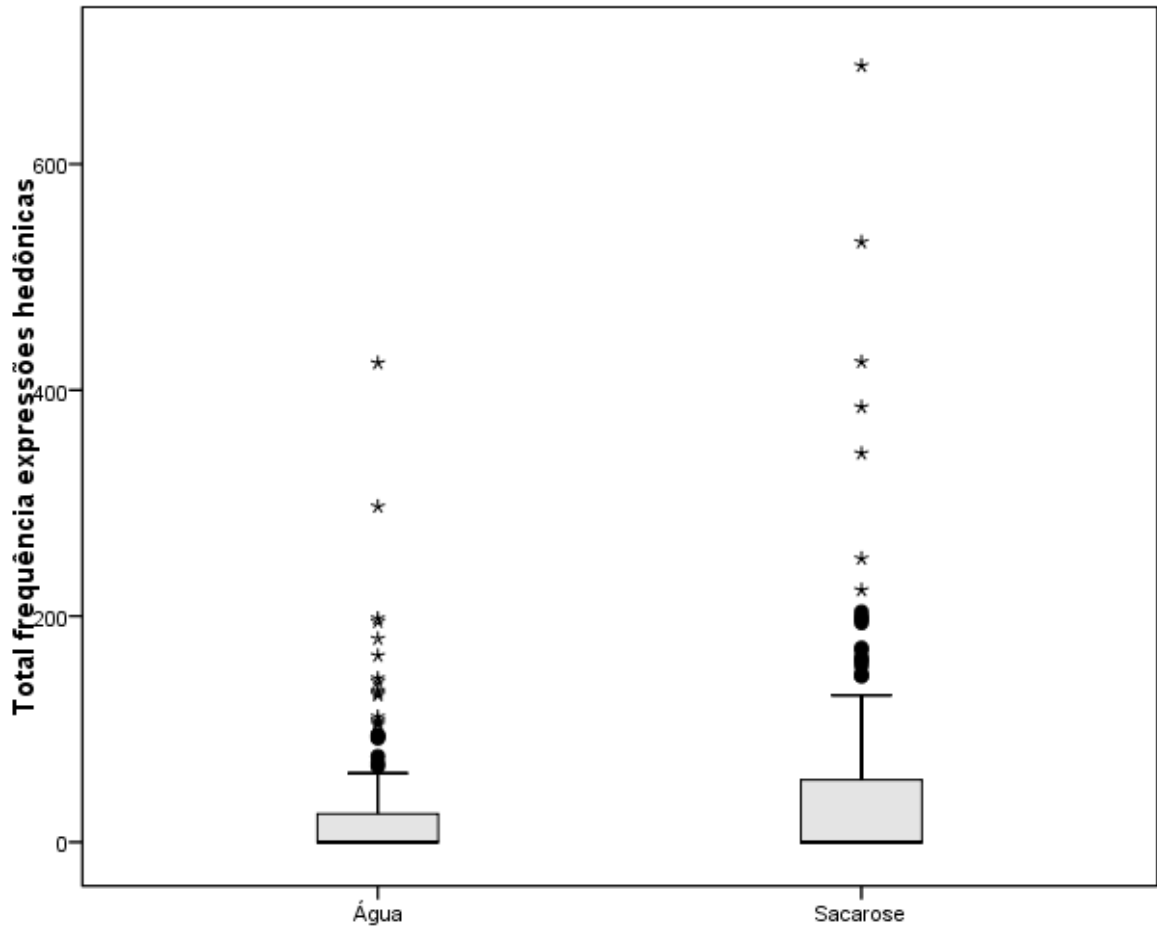


Figura 03 – Box-plot da frequência total de expressões hedônicas em relação à água e sacarose em 60 segundos. A linha dentro da caixa representa a mediana. Os limites inferior e superior da caixa representam os percentis 25 e 75, respectivamente. As barras de erro inferior e superior representam a mediana $\pm 1,5$ (amplitude interquartílica). Os círculos e asteriscos representam os valores extremos da amostra.

Objetivo 1 - A frequência total de reações faciais hedônicas ao estímulo oral doce em recém-nascidos expostos e não expostos ao tabagismo materno durante a vida intrauterina não foi diferente entre os grupos ($p=0,051$). Figura 04 e Tabela 2.

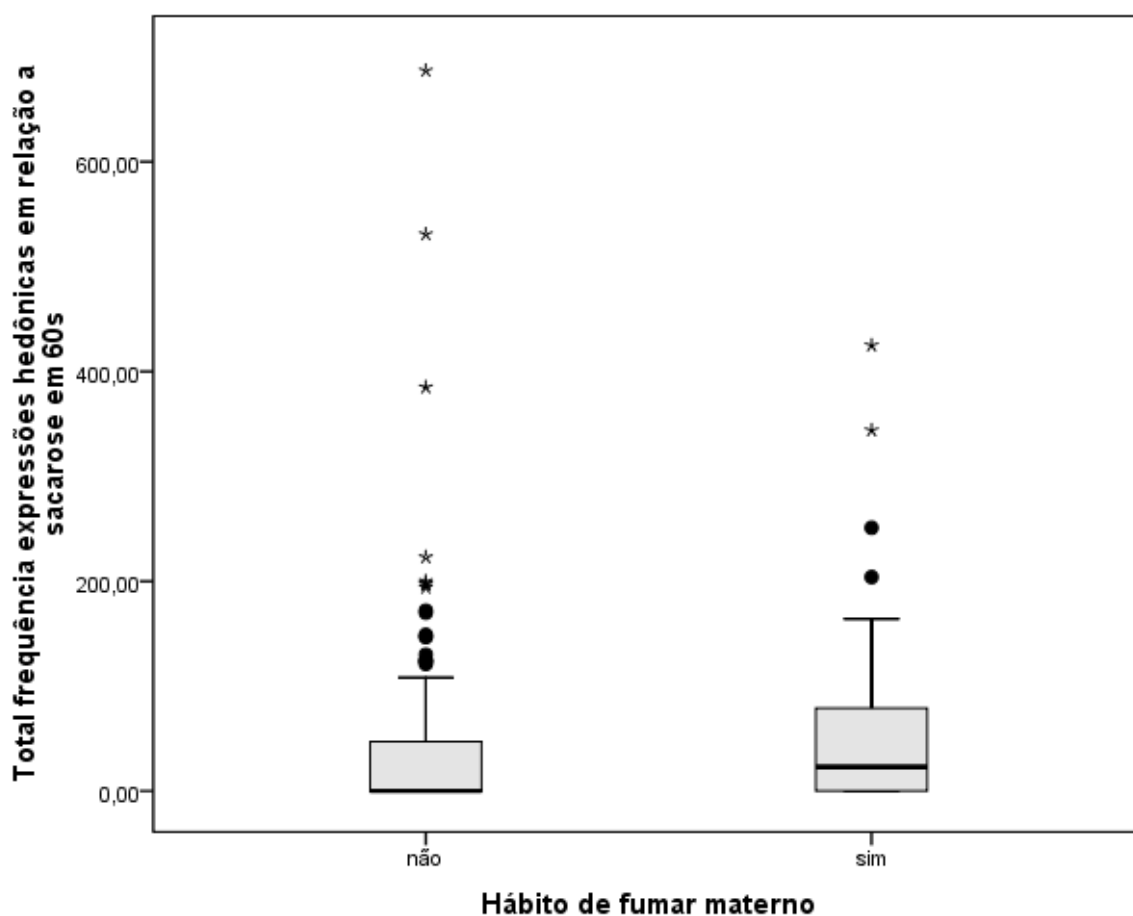


Figura 04 – Box-plot da frequência total de expressões hedônicas em relação à sacarose em 60 segundos conforme tabagismo materno durante a gestação. A linha dentro da caixa representa a mediana. Os limites inferior e superior da caixa representam os percentis 25 e 75, respectivamente. As barras de erro inferior e superior representam a mediana $\pm 1,5$ (amplitude interquartílica). Os círculos e asteriscos representam os valores extremos da amostra.

A Frequência total e expressão facial hedônica conforme exposição ao tabagismo materno durante a gestação está apresentada na Tabela 2.

Quando comparadas as frequências totais de expressões hedônicas em relação à sacarose em 60 segundos entre os grupos expostos e não expostos ao tabagismo materno durante a gestação, não houve diferença estatística ($p=0,051$). Mesmo quando ajustado para escolaridade, peso ao nascer, comprimento ao nascer, perímetro cefálico ao nascimento, razão de crescimento fetal e tempo da última mamada, permanece sem associação significativa ($F(1,188)=1,56$; $p=0,214$) com o tabagismo materno durante a gestação. No entanto, verificando os valores extremos na Figura 4, observa-se que o grupo exposto ao tabagismo na gestação apresenta menos variabilidade do que o grupo não exposto, provavelmente devido ao “congelamento” da reação hedônica no grupo exposto. Desta forma, optou-se por comparar os dados extremos através do teste de *Moses* para reações extremas. Este teste tem por hipótese nula que os valores extremos estão igualmente distribuídos em ambas as populações. Ao realizar o teste estatístico, o valor $p<0,001$ indicou que o grupo exposto tem menos valores extremos que o grupo não exposto, podendo reiterar a hipótese de congelamento das reações hedônicas.

Tabela 2 – Frequência total e expressão facial hedônica conforme exposição ao tabagismo materno durante a gestação

Variáveis	Amostra total	Exposição ao tabagismo materno durante a gestação		p
		Não (n=150)	Sim (n=50)	
Frequência da expressão facial hedônica em 1 minuto				
Água	193	0 (0 – 27)	0 (0 – 21,3)	0,646*
Sacarose	200	0 (0 – 47,5)	23 (0 – 80)	0,051*
Expressão facial hedônica à sacarose	200			0,473**
Presente		67 (44,7)	23 (58,0)	
Ausente		83 (55,3)	21 (42,0)	

Legenda: Dados apresentados como mediana (percentis 25-75) ou n (%); * teste de Mann-Whitney. ** teste qui-quadrado.

8 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a existência de diferença no padrão de resposta hedônica ao gosto doce entre os recém-nascidos expostos ao tabagismo materno durante a vida intrauterina.

Nota-se também, que os recém-nascidos expostos ao tabagismo na vida intrauterina não apresentaram mais expressões faciais hedônicas resultantes da ingestão de substância doce, entretanto, observamos que recém-nascidos expostos ao tabagismo na vida intrauterina parecem ter as expressões faciais congeladas/sensibilizadas em relação ao consumo de uma substância doce, uma vez que recém-nascidos não expostos atingem níveis maiores de prazer em relação à ingestão de substância doce. Pode-se propor que o tabagismo materno leva a uma sensibilidade ao prazer provocada pelo gosto doce e, possivelmente, os indivíduos com esta sensibilidade poderiam aumentar o consumo alimentar por doce para tentar chegar a um maior grau de prazer. Curiosamente, um estudo demonstrou que adultos jovens expostos ao tabagismo materno na vida intrauterina consumiam mais carboidratos em relação às proteínas (AYRES *et al.*, 2011).

Portanto, os resultados sugerem a existência de respostas hedônicas diferenciadas para gosto doce associada à exposição ao tabagismo materno na vida intrauterina, demonstrando um possível comportamento alimentar diferenciado ao enfrentar alimentos que contenham esse gosto. Acrescenta-se que o resultado obtido não foi modificado com o ajuste das covariáveis propostas: peso ao nascimento, comprimento ao nascimento, duração da gestação, escolaridade, razão de crescimento fetal e tempo da última mamada até a hora do teste para peso ao nascer.

Reforça-se que a variável tempo da última mamada até a hora do teste foi usada como ajuste no modelo estatístico, pois poderia influenciar a frequência de reações faciais

hedônicas, pelo fato do recém-nascido estar com fome na hora do teste, mesmo que não se relacionando com o desfecho, o resultado não foi modificado após ajuste.

As variáveis, tempo de vida na hora do teste e o sexo, não apresentaram associação com a frequência de expressões faciais hedônicas ao gosto doce. Confirmando o nosso achado, um estudo também demonstrou que não há correlações estatisticamente significativas entre a idade na hora do teste e ingestão de diferentes soluções. Neste artigo os autores também não encontraram associação do sexo com a ingestão de soluções gustativas (BEAUCHAMP e MORAN, 1982).

As variáveis, renda familiar, idade materna, escolaridade materna, idade gestacional, comprimento ao nascimento do recém-nascido, perímetro cefálico do recém-nascido, IMC pré-gestacional, Apgar 1º minuto, Apgar 5º minuto e número de consultas de pré-natal não estiveram associadas com as frequências das reações faciais para substância doce em expostos ao tabagismo materno na vida intrauterina.

Embora em estudo anterior tenhamos identificado uma associação entre restrição de crescimento intrauterino (RCIU) grave com reações faciais hedônicas em recém-nascidos, neste estudo não foi encontrada esta associação, possivelmente devido à amostra ser composta de recém-nascidos com grau leve de RCIU. No estudo anterior, as reações faciais hedônicas ao doce e a RCIU se correlacionavam inversamente, quanto mais restrito era o recém-nascido, menos reações hedônicas eram contabilizadas (AYRES *et al.*, 2012).

Propomos que esta capacidade de detectar a sensação prazerosa associada ao açúcar, mas esteja congelada, não atingindo o mesmo nível de prazer que o controle, predispõe a desenvolver um aumento do consumo de alimentos palatáveis mais tarde na vida. O aumento da preferência por alimentos palatáveis poderia ser um fator importante para o desenvolvimento da obesidade e sobrepeso na infância e vida adulta, já descrita nesta

população de indivíduos expostos ao tabagismo materno na vida uterina (OKEN *et al.*, 2005; VON KRIES *et al.*, 2000; MENDEZ *et al.*, 2008; POWER e JEFFERIS, 2002).

Uma hipótese alternativa para os achados desta pesquisa, é que a resposta hedônica distinta ao gosto doce em um período crítico do desenvolvimento pode alterar circuitos neurais responsáveis pela resposta hedônica ao doce, podendo levar a um consumo diferenciado ao longo da vida.

Os achados desta pesquisa permitem inferências com os trabalhos de Berridge e colaboradores, pois, mesmo que os trabalhos tenham sido desenvolvidos em ratos é possível relacionar neurobiologicamente os achados. Os pesquisadores descreveram em ratos as regiões hedônicas (*hotspots* hedônicos) no núcleo accumbens e pálido ventral e que o uso de opióides poderia amplificar sinais para resposta hedônica ao gosto doce (PECIÑA, 2006). O tabagismo materno pode amplificar os sinais destas regiões, através de uma alteração nestes sistemas neurais. Um estudo demonstrou que o consumo de cocaína pela mãe na gestação ou exposição ao tabagismo materno pode afetar diferencialmente a maturação das estruturas cerebrais e estão com maior susceptibilidade à impulsividade aumentada (LIU *et al.*, 2013).

Estudo elegante demonstrou que há alterações significativas em relação ao circuito neural que está relacionado com reforço natural e de drogas. Esse estudo foi realizado em animais e avaliou se o tratamento com nicotina na gestação de ratas modificava o sistema dopaminérgico. Os resultados sugeriram que a exposição à nicotina durante a vida intrauterina pode induzir a alterações em ambas as vias naturais e recompensa de drogas (FRANKE *et al.*, 2008).

Os estudos usando modelos animais demonstraram alterações na estrutura e função do cérebro após a exposição pré-natal à nicotina, principalmente nas vias neurais relacionadas a questões comportamentais e de recompensa (BUBLITZ e STROUD, 2012).

Embora o núcleo accumbens também esteja relacionado com o “querer”, existe sub-região encefálica hedônica bem descrita na concha medial do núcleo, sendo possível inferir que recém-nascidos expostos possam ter uma distinção nesta região. Um estudo que avaliou ratos adolescentes expostos à nicotina na vida intrauterina demonstrou que os ratos expostos tinham o núcleo accumbens diminuído (KANE, *et al.*, 2004). Estas investigações sugerem que a exposição à nicotina gestacional poderia modificar estruturas sabidamente relacionadas com recompensa/reforço (KANE, *et al.*, 2004).

Considerando que as expressões faciais hedônicas constituem um aspecto importante da sensação de prazer e recompensa associada a gostos agradáveis, esse comportamento pode significar maior consumo de alimentos que possuam este tipo de gosto ao longo da vida (LEVINE *et al.*, 2003). Além disso, as expressões hedônicas refletem a atividade de regiões específicas do sistema mesolímbico (PECINA *et al.*, 2006), regiões as quais também são ativadas após visualização de alimentos saborosos (VOLKOW e FOWLER, 2000). Como variações na responsividade desse circuito predizem o risco para o aumento de peso no futuro (STICE *et al.*, 2010), variações nesse comportamento podem significar também risco para superalimentação e/ou sobrepeso no futuro.

Pesquisas tem se concentrado em estudar as respostas neurais ao gosto doce (BERRIDGE *et al.*, 2010). Estimulação dos receptores ao doce ativa regiões cerebrais relacionadas ao prazer e geradora de recompensa (BERRIDGE *et al.*, 2008) através de circuitos e mecanismos muito semelhantes com o observado para o álcool e para as drogas (PECIÑA *et al.*, 2006). As vias neurais que ligam gosto doce para recompensas podem ser parcialmente responsável por preferências inatas para gostos doces, e também pode ser reforçada por repetidas exposições e consumo de alimentos doces.

Um interessante estudo demonstrou que adolescentes expostos ao tabagismo materno na vida intrauterina exibiram menor volume da amígdala ($P < 0,001$), estrutura relacionada ao circuito hedônico (HAGHIGHI *et al.*, 2013).

Esta pesquisa tem algumas limitações, como não ter acrescentado na amostra os recém-nascidos expostos ao tabagismo materno que ficaram mais de 24 horas longe das mães no alojamento conjunto, uma vez que este grupo provavelmente é mais vulnerável a alguma diferenciação nos circuitos neurais mesolímbicos. Também considero uma limitação o tamanho de efeito grande e amostra pequena, entretanto por ser tratar de um trabalho com alto grau de ineditismo, não se tinham dados em relação ao tamanho de efeito.

Como pontos fortes destaca-se que a pesquisa foi realizada com recém-nascidos saudáveis, toda a amostra foi coletada por um mesmo pesquisador e os recém-nascidos estavam em um momento acolhedor com suas mães.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tabagismo materno durante a gestação pode estar relacionado a um padrão específico de expressões faciais hedônicas para o gosto doce no início da vida. Não existe diferença estatística entre frequência de reações faciais hedônicas a substâncias doces em recém-nascidos expostos ao tabagismo na vida intrauterina, entretanto, observamos que recém-nascidos expostos parecem ter as expressões faciais congeladas/sensibilizadas em relação ao consumo de uma substância doce, uma vez que recém-nascidos não expostos atingem níveis maiores de prazer em relação à ingestão de substância doce.

As reações hedônicas representam o impacto hedônico ao gosto doce, e essas estão sensibilizadas/congeladas nesta população, demonstrando que as vias relacionadas ao prazer podem estar alteradas. Desta forma, é relevante desenvolver estratégias nutricionais para um consumo alimentar diferenciado por doce, em função desta sensibilização. É possível também que o tabagismo materno proporcione aos recém-nascidos um impacto hedônico diferenciado à substância doce, levando esses indivíduos a consumir maior quantidade deste tipo de alimentos para a busca deste prazer, aumentando o risco a doenças sabidamente relacionadas ao consumo alterado ao doce.

Esta pesquisa é a primeira evidência de que ocorre uma distinção da resposta hedônica para o gosto doce em recém-nascidos expostos ao tabagismo materno durante a vida intrauterina. O tabagismo materno é um hábito de alto risco para a criança, e normalmente este hábito vem acompanhado com o contexto de vulnerabilidade social, demonstrando que ter conhecimento sobre este desfecho é essencial na prevenção de futuras doenças não transmissíveis, sabidamente relacionadas com consumo aumentado de alimentos palatáveis.

A relação desta circuitaria neural do prazer/recompensa com o controle do apetite se torna essencial, uma vez que tem a capacidade de modificar o consumo alimentar, pela

questão do “gostar/prazer” de um alimento ou gosto e não pelo equilíbrio nutricional (necessidades nutricionais). Como estão envolvidas vias de recompensas, outros estímulos prazerosos poderão substituir este consumo específico por alimentos que agem nessas vias, como os alimentos palatáveis.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(1):20-39.
2. Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *J Nutr.* 2009 Mar;139(3):623-8. doi: 10.3945/jn.108.097584. Epub 2009 Jan 28. Review. PubMed PMID: 19176748; PubMed
3. Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP. Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr.* 2012;2012:657379.
4. Ayres C, Silveira PP, Barbieri MA, Portella AK, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, Goldani MZ. Exposure to maternal smoking during fetal life affects food preferences in adulthood independent of the effects of intrauterine growth restriction. *J Dev Orig Health Dis.* 2011 Jun;2(3):162-7.
5. Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, Goldani MZ. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res.* 2009 Feb;65(2):215-20
6. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol.* 2002; 31(6):1235-9.

7. Barker DJ, Gluckman, PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993 Apr; 341(8850):938-41.
8. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998 Aug; 95(2):115-28.
9. Batstra L, Hadders AM, Neeleman J. Effect of antenatal exposure to maternal smoking on behavioural problems and academic achievement in childhood: prospective evidence from a Dutch birth cohort. *Early Hum Dev*. 2003; 75(1-2):21-33.
10. Beauchamp GK, Cowart BJ, Mennella JA, Marsh RR. Infant salt taste: developmental, methodological, and contextual factors. *Dev Psychobiol*. 1994 Sep;27(6):353-65. PubMed PMID: 8001725.
11. Beauchamp GK, Cowart BJ, Moran M. Developmental changes in salt acceptability in human infants. *Dev Psychobiol*. 1986 Jan;19(1):17-25. PubMed PMID: 3699249.
12. Beauchamp GK, Moran MM. Dietary experience and sweet taste preference in human infants. *Appetite* 1982; 3:139-152.
13. Bergamasco NH, Beraldo KE. Facial expressions of neonate infants in response to gustatory stimuli. *Braz J Med Biol Res*. 1990;23(3-4):245-9).

14. Bernstein IM, Plociennik K, Stahle S, Badger GJ, Secker-Walker R. Impact of maternal cigarette smoking on fetal growth and body composition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000 Oct; 183(4):883-6.
15. Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1996;20:1–25).
16. Berridge KC, Ho CY, Richard JM, DiFeliceantonio AG. The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Res.* 2010 Sep 2;1350:43-64
17. Berridge KC, Kringelbach ML. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Aug;199(3):457-80
18. Berridge KC, Kringelbach ML. Pleasure systems in the brain. *Neuron.* 2015 May 6;86(3):646-64.
19. Berridge KC. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000 Mar;24(2):173-98. Review. PubMed PMID: 10714382
20. Berridge KC. Pleasures of the brain. *Brain and Cognition* 2003; 52:106–128.
21. Berridge, KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, v.191, n.3, p.391-431, 2007.

22. Beyerlein A, Rückinger S, Toschke AM, Schaffrath Rosario A, von Kries R. Is low birth weight in the causal pathway of the association between maternal smoking in pregnancy and higher BMI in the offspring? *Eur J Epidemiol.* 2011 May;26(5):413-20.
23. Billaud N, Lemarie P. Negative effects of maternal smoking during the course of pregnancy. *Arch Pediatr.* 2001 Aug; 8(8):875-81.
24. Blake KV, Gurrin LC, Evans SF, Beilin LJ, Landau LI, Stanley FJ. Maternal cigarette smoking during pregnancy, low birth weight and subsequent blood pressure in early childhood. *Early Hum Dev.* 2000 Feb;57(2):137-47.
25. Bradley RM, Stern IB. The development of the human taste bud during the foetal period. *J Anat.* 1967 Sep;101(Pt 4):743-52.
26. Brining SK, Belecky TL, Smith DV. Taste reactivity in the hamster. *Physiol Behav* 1991;49:1265–72.
27. Bublitz MH, Stroud LR. Maternal smoking during pregnancy and offspring brain structure and function: review and agenda for future research. *Nicotine Tob Res.* 2012 Apr;14(4):388-97
28. Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002 May;26(3):321-52. Review. PubMed PMID: 12034134.

29. Castro DC, Berridge KC. Advances in the neurobiological bases for food 'liking' versus 'wanting'. *Physiol Behav.* 2014 Sep;136:22-30.
30. Chao-Yi Ho, Berridge KC. An Orexin Hotspot in Ventral Pallidum Amplifies Hedonic 'Liking' for Sweetness. *Neuropsychopharmacology.* 2013 38, 1655–1664
31. Chen H, Morris MJ. Maternal smoking-A contributor to the obesity epidemic? *Obes Res Clin Pract.* 2007 Oct;1(3):I-II. doi: 10.1016/j.orcp.2007.07.004. PubMed PMID: 24351541.
32. Chen H, Saad S, Sandow SL, Bertrand PP. Cigarette smoking and brain regulation of energy homeostasis. *Front Pharmacol.* 2012 Jul 25;3:147. doi: 10.3389/fphar.2012.00147. eCollection 2012. PubMed PMID: 22848202; PubMed Central PMCID: PMC3404499.
33. Cromwell HC, Berridge KC. Where does damage lead to enhanced food aversion: the ventral pallidum/substantia innominata or lateral hypothalamus? *Brain Res* 1993;624:1–1
34. Crystal SR, Bernstein IL. Infant Salt Preference and Mother's Morning Sickness. *Appetite*, v. 30, n 3, June 1998, Pages 297-307
35. Davis ME, Potter EL. Intrauterine respiration of the human fetus. *J Am Med Assoc*, (1946). *131*(15), 1194-1201.

36. Drewnowski A, Mennella JA, Johnson SL, Bellisle F. Sweetness and food preference. *J Nutr.* 2012 Jun;142(6):1142S-8S.
37. Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005;8:1481–1489
38. Fernstrom JD, Munger SD, Sclafani A, De Arujo I, Roberts A, MolinaryS. Mechanisms for sweetness - low-calorie sweeteners, appetite and weight control: what the science tells us - mechanisms for sweetness." *J Nutr.* 2012;142:1134S
39. Franke RM, Park M, Belluzzi JD, Leslie FM. Prenatal nicotine exposure changes natural and drug-induced reinforcement in adolescent male rats. *Eur J Neurosci.*2008 Jun;27(11):2952-61.
40. Ganchrow JR, Steiner JE, Daher M. Neonatal facial expressions in response to different qualities and intensities of gustatory stimuli. *Infant Behav Dev* 1983;6:189–200.
41. Gluckman PD, Hanson MA, Mitchell MD. Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. *Genome Med.* 2010 Feb 24;2(2):14.
42. Granger DA, Blair C, Willoughby M, Kivlighan KT, Hibel LC, Fortunato CK, et al.. Individual differences in salivary cortisol and alpha-amylase in mothers and their

- infants: relation to tobacco smoke exposure. *Dev Psychobiol.* 2007 Nov; 49(7):692-701.
43. Haghghi A, Schwartz DH, Abrahamowicz M, Leonard GT, Perron M, Richer L, Veillette S, Gaudet D, Paus T, Pausova Z. Prenatal exposure to maternal cigarette smoking, amygdala volume, and fat intake in adolescence. *JAMA Psychiatry.* 2013 Jan;70(1):98-105. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2012.1101. PubMed PMID: 22945562.
44. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Int J Epidemiol.* 2013 Oct;42(5):1215-22.
45. Horta BL, Victora CG, Menezes AM, Halpern R, Barros FC. Low birthweight, preterm births and intrauterine growth retardation in relation to maternal smoking. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1997 Apr; 11(2):140-51.
46. <http://www.ghc.com.br/default.asp?idMenu=institucional&idSubMenu=1>. Acesso no dia 03 de fevereiro de 2015.
47. Jones A, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulden P, Phillips DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(5):1868-71.

48. Kane VB, Fu Y, Matta SG, Sharp BM. Gestational nicotine exposure attenuates nicotine-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens shell of adolescent Lewis rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Feb;308(2):521-8
49. Kannisto V, Christensen K, Vaupel JW. No increased mortality in later life for cohorts born during famine. *Am. J. Epidemiol.* 1997 Jun 1; 145(11):987-94.
50. Keys DP, Fidanza F, Kcarvonen MJ, Kimura N, Taylor HK. Indices of relative weight and obesity. *J Chron Dis* 1972 Jul ;25(6):329-43.
51. Kramer MS, Platt R, Yang H, McNamara H, Usher RH. Are all growth-restricted newborns created equal(ly)? *Pediatrics* 1999 Mar;103(3):599-602.
52. Kringelbach ML; Berridge KC. Towards a functional neuroanatomy of pleasure and happiness. *Trends. Cogn. Sci.*, v.13, n.11, p.479-87, 2009.
53. Kringelbach ML, et al. Activation of the human orbitofrontal cortex to a liquid food stimulus is correlated with its subjective pleasantness. *Cerebral Cortex* 2003;13:1064–1071
54. Kringelbach ML, Rolls ET. The functional neuroanatomy of the human orbitofrontal cortex: evidence from neuroimaging and neuropsychology. *Progress in Neurobiology* 2004;72:341–372

55. Kroeff LR, Mengue SS, Schmidt MI, Duncan BB, Favaretto ALF, Nucci LB. Fatores associados ao fumo em gestantes avaliadas em cidades brasileiras. *Rev. Saúde Pública.* 2004 2(38).
56. Küpers LK, Xu X, Jankipersadsing SA, Vaez A, la Bastide-van Gemert S, Scholtens S, Nolte IM, Richmond RC, Relton CL, Felix JF, Duijts L, van Meurs JB, Tiemeier H, Jaddoe VW, Wang X, Corpeleijn E, Snieder H. DNA methylation mediates the effect of maternal smoking during pregnancy on birthweight of the offspring. *Int J Epidemiol.* 2015 Apr 10.
57. La Merrill MA, Cirillo PM, Krigbaum NY, Cohn BA. The impact of prenatal parental tobacco smoking on risk of diabetes mellitus in middle-aged women. *J Dev Orig Health Dis.* 2015 Jun;6(3):242-9
58. Levine AS, Kotz CM, Gosnell BA. Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance. *Am J Clin Nutr.* 2003 Oct;78(4):834S-842S.
59. Lipchock SV, Reed DR, Mennella JA. The gustatory and olfactory systems during infancy: implications for development of feeding behaviors in the high-risk neonate. *Clin Perinatol.* 2011 Dec;38(4):627-41.
60. Liu J, Lester BM, Neyzi N, Sheinkopf SJ, Gracia L, Kekatpure M, Kosofsky BE. Regional brain morphometry and impulsivity in adolescents following prenatal exposure to cocaine and tobacco. *JAMA Pediatr.* 2013 Apr;167(4):348-54

61. Maller O, Desor JA. Effect of taste on ingestion by human newborns. *Symp Oral Sens Percept.* 1973;279–91
62. Maone TR, Mattes RD, Bernbaum JC, Beauchamp GK. A new method for delivering a taste without fluids to preterm and term infants. *Dev Psychobiol.* 1990;23:179–91
63. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:15075–80. 14.
64. Mattes RD. Is there a fatty acid taste? *Annu Rev Nutr.* 2009;29:305-27
65. Melchior M, Hersi R, van der Waerden J, Larroque B, Saurel-Cubizolles MJ, Chollet A, Galéra C; EDEN Mother-Child Cohort Study Group. Maternal tobacco smoking in pregnancy and children's socio-emotional development at age 5: The EDEN mother-child birth cohort study. *Eur Psychiatry.* 2015 Apr 2.
66. Mendez MA, Torrent M, Ferrer C, Ribas-Fitó N, Sunyer J. Maternal smoking very early in pregnancy is related to child overweight at age 5-7. *Am J Clin Nutr.* 2008 Jun; 87(6):1906-13.
67. Mennella J.A., Castor S.M. Sensitive period in flavor learning: Effects of duration of exposure to formula flavors on food likes during infancy. *Clin. Nutr.* (2012). 31, 1022–1025

68. Mennella JA, Finkbeiner S, Reed DR. The proof is in the pudding: children prefer lower fat but higher sugar than do mothers. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Oct;36(10):1285-91.
69. Mennella JA, Jagnow CP, Beauchamp GK. Prenatal and postnatal flavor learning by human infants. *Pediatrics* (2001) 107, E88–E93.
70. Montgomery SM, Ehlin A, Ekbom A. Smoking during pregnancy and bulimia nervosa in offspring. *J Perinat Med*. 2005;33(3):206-11. PubMed PMID: 15914342.
71. Moylan S, Gustavson K, Øverland S, Karevold EB, Jacka FN, Pasco JA, Berk M. The impact of maternal smoking during pregnancy on depressive and anxiety behaviors in children: the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *BMC Med*. 2015 Feb 3;13:24.
72. Muraro AP, Gonçalves-Silva RM, Moreira NF, Ferreira MG, Nunes-Freitas AL, Abreu-Villaça Y, Sichieri R. Effect of tobacco smoke exposure during pregnancy and preschool age on growth from birth to adolescence: a cohort study. *BMC Pediatr*. 2014 Apr 10;14:99. doi: 10.1186/1471-2431-14-99
73. Oken E, Huh SY, Taveras EM, Rich-Edwards JW, Gillman MW. Associations of maternal prenatal smoking with child adiposity and blood pressure. *Obes Res*. 2005 Nov;13(11):2021-8

74. Ong KKL, Ahmed AL, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ* 2000; 320: 967-71.
75. Peciña S, Smith KS, Berridge KC. Hedonic hot spots in the brain. *Neuroscientist*. 2006. 12(5): 500–511.
76. Pepino MY, Mennella JA. Habituation to the pleasure elicited by sweetness in lean and obese women. *Appetite*. 2012 Jun;58(3):800-5. doi: 10.1016/j.appet.2012.01.026. Epub 2012 Feb 2. PubMed PMID: 22326885; PubMed
77. Perälä MM, Männistö S, Kaartinen NE, Kajantie E, Osmond C, Barker DJ, Valsta LM, Eriksson JG. Body size at birth is associated with food and nutrient intake in adulthood. *PLoS One*. 2012;7(9):e46139.
78. Perälä MM, Moltchanova E, Kaartinen NE, Männistö S, Kajantie E, Osmond C, Barker DJ, Valsta LM, Eriksson JG. The association between salt intake and adult systolic blood pressure is modified by birth weight. *Am J Clin Nutr*. 2011 Feb;93(2):422-6. doi: 10.3945/ajcn.2010.30022. Epub 2010 Nov 10. PubMed PMID: 21068355.
79. Power C, Jefferis BJ. Fetal environment and subsequent obesity: a study of maternal smoking. *Int J Epidemiol*. 2002 Apr; 31(2):413-9.

80. Pringle PJ, Geary MP, Rodeck CH, Kingdom JC, Kayamba-Kay's S, Hindmarsh PC. The influence of cigarette smoking on antenatal growth, birth size, and the insulin-like growth factor axis. *Clin. Endocrinol. Metab.* 2005 May; 90(5):2556-62.
81. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Dec 20;185(1-2):93-8.
82. Rosenstein D, Oster H. Differential facial responses to four basic tastes in newborns. *Child Dev.* 1988 Dec;59(6):1555-68. PubMed PMID: 3208567.
83. Scott TR. Taste: the neural basis of body wisdom. *World Rev Nutr Diet.* 1992;67:1-39. Review. PubMed PMID: 1557909).
84. Schwartz C, Issanchou S, Nicklaus S. Developmental changes in the acceptance of the five basic tastes in the first year of life. *Br J Nutr.* 2009 Nov;102(9):1375-85. doi: 10.1017/S0007114509990286.
85. Sclafani A. Sweet taste signaling in the gut. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:14887-8.
86. Smith KS, Berridge KC. Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J Neurosci.* 2007 Feb 14;27(7):1594-605. PubMed PMID: 17301168

87. Smith KS, Tindell AJ, Aldridge JW, Berridge KC. Ventral pallidum roles in reward and motivation. *Behavioural Brain Research*. 2009.196(2):55–167.
88. Steiner JE. Discussion paper: innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. *Ann NY Acad Sci* 1974;237:229–33
89. Steiner JE, Glaser D. Differential behavioral responses to taste stimuli in non-human primates. *J Human Evol* 1984;13:709–23.
90. Steiner JE, Glaser D, Hawilo ME, Berridge KC. Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001 Jan;25(1):53-74. PubMed PMID: 11166078.
91. Steiner JE. The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants. *Symp Oral Sens Percep* 1973;4:254–78.
92. Stice E, Yokum S, Bohon C, Marti N, Smolen A. Reward circuitry responsivity to food predicts future increases in body mass: moderating effects of DRD2 and DRD4. *Neuroimage*. 2010 May 1;50(4):1618-25. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.01.081. Epub 2010 Jan 29. PubMed PMID: 20116437; PubMed Central PMCID: PMC3987805.
93. Suzuki K, Sato M, Zheng W, Shinohara R, Yokomichi H, Yamagata Z. Effect of maternal smoking cessation before and during early pregnancy on fetal and childhood growth. *J Epidemiol*. 2014;24(1):60-6.

94. Tatzler E, Schubert MT, Timischl W, Simbrunger G. Discrimination of taste and preference for sweet in premature babies. *Early Hum Dev* 1985; 12:23-30.
95. Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den Bree M, Thomas H, et al. Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry* 2003 Nov; 160(11):1985-9.
96. Tounian P. Programming towards childhood obesity. *Ann Nutr Metab.* 2011;58 Suppl 2:30-41. doi: 10.1159/000328038. Epub 2011 Aug 12. Review. PubMed PMID: 21846979
97. Valente MH, da Silva Gomes FM, Benseñor IJ, Brentani AV, de Ulhôa Escobar AM, Grisi SJ. Relation between birth weight, growth, and subclinical atherosclerosis in adulthood. *Biomed Res Int.* 2015;2015:926912.
98. Ventura AK, Worobey J. Early influences on the development of food preferences. *Curr Biol.* 2013 May 6;23(9):R401-8. doi: 10.1016/j.cub.2013.02.037. Review. PubMed PMID: 23660363.
99. Vielwerth SE, Jensen RB, Larsen T, Greisen G. The impact of maternal smoking on fetal and infant growth. *Early Hum Dev.* 2007 Aug; 83(8):491-5.

100. Volkow ND, Fowler JS. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*, v. 10, n. 3, p. 318)25, Mar 2000.
101. Von Kries R, Toschke AM, Koletzko B, Slikker W Jr. Maternal smoking during pregnancy and childhood obesity. *Am J Epidemiol*. 2002 Nov 15; 156(10):954-61.
102. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med*. 2009 Sep;27(5):358-68. doi: 10.1055/s-0029-1237424.
103. Walker SP, Gaskin PS, Powell CA, Bennett F. The effects of birth weight and postnatal linear growth retardation on body mass index, fatness and fat distribution in mid and late childhood. *Public Health Nutr* 2002; 5(3): 391-6.
104. Weiland R, Ellgring H, Macht M. Gustofacial and olfactofacial responses in human adults. *Chem Senses*. 2010 Nov;35(9):841-53).
105. Wideroe M, Vik T, Jacobsen G, Bakketeig LS. Does maternal smoking during pregnancy cause childhood overweight? *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2003 Apr; 17(2):171-9.

106. Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJ. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*. 2009;139:234–44. 9-11

107. Zimmermann E, Gamborg M, Sørensen TI, Baker JL. Sex differences in the association between birth weight and adult type 2 diabetes. *Diabetes*. 2015 Aug 7.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Tabagismo materno durante a gestação e reações hedônicas a estímulos gustativos em recém-nascidos.

Local de realização da pesquisa: Alojamento Conjunto.

Duração dos procedimentos: 20 minutos.

Estamos realizando uma pesquisa com as mães e seu recém-nascido, nosso objetivo é verificar a associação do tabagismo materno e as expressões faciais dessas crianças frente a ingestão de substância doce e neutra. Se você aceitar participar deste estudo, serão realizadas medidas com as mães e seu filho. Para avaliar seu filho, será realizada uma avaliação da expressão facial. Esta avaliação é simples, não apresenta dor e não representa riscos para a saúde da criança, com um mínimo de desconforto. A avaliação da expressão facial consiste em um teste que tem como objetivo, apenas, identificar as reações de prazer e aversão quando consumida pequena quantidade de solução doce e água. Será fornecida para seu filho uma solução doce (que não traz risco para saúde do seu filho) e outra solução de água pura, onde a reação (expressão facial) do seu filho será analisada através de uma filmagem, que será utilizada somente para fins desta pesquisa.

Será realizado um questionário sócio-econômico (perguntas sobre a moradia, escolaridade, renda familiar), serão coletados dados da carteirinha de gestante e será aplicado um questionário sobre o hábito de fumar da mãe. Iremos anotar alguns dados do prontuário do recém-nascido e de sua mãe, como, peso, exames, comprimento e perímetro cefálico.

Saliença-se que os dados serão publicados sem o nome dos participantes. Você poderá desistir do estudo em qualquer momento e não terá prejuízo no atendimento do seu (a) filho (a).

() Autorizo a coleta de dados da carteirinha de gestante, coleta de dados do nascimento do meu filho, teste da expressão facial, realização do questionário sócio-econômico, questionário sobre o hábito de fumar materno e coleta de dados dos prontuários maternos e do recém-nascidos.

Se você tiver alguma pergunta sinta-se à vontade para fazê-la em qualquer momento durante a pesquisa.

A pesquisadora responsável por esta pesquisa é a Nutricionista Mestre Caroline Ayres, fone: (51) 30296169 e em caso de dúvida pode também entrar em contato pelo celular (51) 96667913 ou pelo email: nutricarolayres@hotmail.com

OHG 197
ADAVORHA 13/08/2018


CEPT/GHC
VERSÃO APROVADA
02 / 08 / 2018

CONTINUAÇÃO APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do GHC (Grupo Hospitalar Conceição), através do Odont. Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone (51) 3357-2407, caso queira questionar algum aspecto ético da pesquisa. O Comitê de Ética fica na rua Francisco Trein 596, Hospital Conceição.

Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.


Paciente: _____
 Nome do responsável: _____
 Assinatura Responsável: _____
 Assinatura da mãe (no caso de mães adolescentes): _____
 Pesquisador Responsável: _____
 Data: ___/___/___

*Endereço Institucional da pesquisadora (Caroline Ayres) e seus orientadores (Professor Dr. Marcelo Zubaran Goldani e Professora Doutora Patrícia Pelufo Silveira):
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre
 Rua Ramiro Barcelos 2400
 Fone: (51) 33598515

Este formulário foi lido para _____
 (nome do paciente ou responsável) em ___/___/___ (data)
 pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

Assinatura da Testemunha
 Nome: _____
 Data: ___/___/___

Assinatura do Pesquisador
 Nome: _____
 Data: ___/___/___


 CEP / GHC
 VERSÃO APROVADA
 02/08/2010

APÊNDICE B - Aceite do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Conceição



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Train, 596
CEP 91380-200 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.2000
CNPJ: 92.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Rubião, 20
CEP 91640-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3387.4100
CNPJ: 92.787.126/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Mostardão, 17
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3314.8200
CNPJ: 92.893.134/0001-63



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 98.244/90

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em 02 de agosto de 2010, reavaliou o estudo apreciado em 28 de julho de 2010 referente ao seguinte projeto de pesquisa:

Projeto: 10-047

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

MARCELO ZUBARAN GOLDANI
PATRICIA PELUFO SILVEIRA
MARILYN AGRANONIK
CAROLINE AYRES

Título: Tabagismo materno durante a gestação e reações hedônicas a estímulos gustativos de recém-nascidos.

Documentação: Aprovados
Aspectos Metodológicos: Aprovados
Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC. Lembramos do compromisso de encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.

Porto Alegre, 02 de agosto de 2010.


Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP/GHC

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO

*Clinical Study***Intrauterine Growth Restriction and the Fetal Programming of the Hedonic Response to Sweet Taste in Newborn Infants****Caroline Ayres,¹ Marilyn Agranonik,¹ André Krumel Portella,¹ Françoise Filion,² Celeste C. Johnston,² and Patrícia Pelufo Silveira^{1, 3}**

Intrauterine growth restriction is associated with increased risk for adult metabolic syndrome and cardiovascular disease, which seems to be related to altered food preferences in these individuals later in life. In this study, we sought to understand whether intrauterine growth leads to fetal programming of the hedonic responses to sweet. Sixteen 1-day-old preterm infants received 24% sucrose solution or water and the taste reactivity was filmed and analyzed. Spearman correlation demonstrated a positive correlation between fetal growth and the hedonic response to the sweet solution in the first 15 seconds after the offer ($r = 0.864$, $P = 0.001$), without correlation when the solution given is water ($r = 0.314$, $P = 0.455$). In fact, the more intense the intrauterine growth restriction, the lower the frequency of the hedonic response observed. IUGR is strongly correlated with the hedonic response to a sweet solution in the first day of life in preterm infants. This is the first evidence in humans to demonstrate that the hedonic response to sweet taste is programmed very early during the fetal life by the degree of intrauterine growth. The altered hedonic response at birth and subsequent differential food preference may contribute to the increased risk of obesity and related disorders in adulthood in intrauterine growth-restricted individuals.

1. Introduction

The fetal origins of adult disease hypothesis states that environmental factors, particularly nutrition, act in early life to program the risks for chronic diseases in

adulthood [1]. In particular, intrauterine growth restriction (IUGR) is known to be associated with insulin resistance [2, 3], obesity [4–7], and cardiovascular disease [8, 9] in adult life. As eating habits can contribute to the development of obesity, diabetes, and cardiovascular disease, one could suggest that persistent nutrient imbalances across the lifespan in people who were born IUGR may explain, at least partially, their increased risk to develop metabolic syndrome later in life. Interestingly, studies from different research groups have shown that IUGR individuals indeed have specific food preferences in adulthood [10–12], naturally choosing to eat more foods rich in carbohydrates and/or fat than non-IUGR individuals. Besides, IUGR girls are more impulsive when facing a sweet reward already at 3 years of age [13]. Therefore, IUGR is associated with changes in feeding behavior and preferences that may promote the metabolic changes previously described in this group. A possible mechanism by which IUGR could permanently alter an individual's food choices is the programming of the sensitivity to the hedonic signaling (i.e., pleasure) associated with the ingestion of a palatable food. Hedonic sensation is reflected in positive patterns of affective orofacial expressions that are homologous between humans and rodents [14–16]. As explained by Berridge [16], the affective pattern of taste reactivity components reflects palatability or affect more closely than it reflects either ingestion or sensation [17, 18]. It was already shown that prenatal protein malnutrition changes the response to reward in adult rodents [19], which may suggest that the same phenomena may be happening in humans. This group of evidence prompted us to propose the hypothesis that IUGR leads to fetal programming of the hedonic responses to the sweet taste, and in the current study we aimed at verifying if IUGR would be related to an altered pattern of affective orofacial expressions to the sweet taste very early in life, addressing this question in preterm infants in their first day of life.

2. Subjects and Methods

This study was performed by secondary analyses of nonused data collected for the purpose of a different project. The original protocol was developed with the objective to investigate the efficacy of routine sucrose analgesia for procedural pain in the first week of life in preterm infants, and was described in detail elsewhere [20, 21]. Briefly, a level III university affiliated NICU in Canada was the site for the study, providing ethics approval by a constituted review board. Infants, who were born between 25 and 31 completed weeks' postconceptional age, were expected to live according to the opinion of the attending neonatologist, were above the fifth percentile weight for gestational age, had intraventricular hemorrhage less than Grade III and no periventricular leukomalacia, were free of major congenital anomalies, and did not require surgery and whose parents consented within 48 hours of birth were included in the study. Enrolled infants were randomly assigned to the sucrose or water group from a computer-generated schedule. Only the project nurses in each site knew the group assignment; treating clinicians were blind to group assignment. Solutions of 0.1mL of 24% sucrose or water were drawn up into sterile syringes and placed in the unit medicine refrigerator. Every time the infant was to undergo an invasive (e.g., heel lance, intravenous cannulation, arterial puncture, and injection) or noninvasive but presumably uncomfortable procedure (e.g., endotracheal tube suctioning, tape/lead removal, and gavage insertion for feeding), the solution in the syringe was administered into the infant's mouth 1 minute before the beginning of the procedure. A small-wide-angle lens camera rested on top of the isolette and was connected to a mat on the floor next to the isolette such that stepping on the mat triggered 5-minute recording. In this way, facial actions could be recorded during painful procedures. While the original study verified the analgesic effect of sucrose in minutes following

the procedure, the current study evaluated the hedonic response using the first 15 seconds of facial capture after the sucrose solution was given orally and immediately before the painful procedure. We used filming from the very first time that the newborn received the oral solution, which occurred in the first 24 hours of life for all the subjects in the current study. The positive hedonic reaction was compiled by adding scores for (a) rhythmic extension of the tongue outwards along the midline, and sometimes upwards, past the outer edge of the lips, often simultaneously accompanied by slight dropping of the jaw; this is followed immediately by retraction of the tongue and closure of the jaw, and the cycle is repeated rhythmically again and again, each cycle lasting 300–1200 ms and (b) lateral nonrhythmic tongue protrusions, which were sweeping extensions of the tongue sideways along the lateral border of the mouth and along the lips on one side of the mouth [15, 22]. A trained observer blinded to the solution given scored the videotapes frameby-frame (1 frame = 1/10 s) watching the first 15 seconds of shooting after the administration of the oral solution. The definition of IUGR was based on the birth weight ratio (BWR), which is the ratio between the infant birth weight and the sex-specific mean birth weight for each gestational age for the local population [23, 24]. For this study, BWR was used as a continuous variable reflecting the degree of IUGR for a given infant.

2.1. Statistical Methods.

Quantitative variables were described using median (25th percentile; 75th percentile), while categorical data were described using absolute (n) and relative (%) frequencies. To establish potential confounders, children who received sucrose or water were compared on key variables including gender, gestational age, birth weight, and BWR using Mann-Whitney test for quantitative variables and Fisher's Exact test for categorical variables. Spearman correlation was used to analyze the relation between

BWR and the hedonic response according to the solution offered. Statistical significance for all analyses was set at $P < 0.05$.

3. Results

Table 1 depicts the baseline characteristics of subjects receiving the different solutions. There were no statistical differences between children that received water versus sucrose regarding gender, birth weight, gestational age, and birth weight ratio (Table 1). There was a positive correlation between the BWR used as a continuous variable and the hedonic response to the sweet solution in the first 15 seconds after the offer ($r = 0.864$, $P = 0.001$). That is, the greater degree of intrauterine growth restriction, the less the frequency of the tongue protrusions demonstrated after the sucrose offer (Figure 1(a)). There was no correlation between BWR and the hedonic response when the solution given was water ($r = 0.314$, $P = 0.544$) (Figure 1(b)).

4. Discussion

In this study we showed that intrauterine growth correlates with the hedonic response to sweet in preterm infants in their first day of life. In preterm newborns born as early as 27 weeks gestation, the intensity of growth restriction is highly and inversely related to the frequency of positive affective reactions to the sweet taste. One could propose that IUGR leads to a decreased sensitivity to the enjoyment elicited by the sweet taste and would possibly overconsume this and other types of palatable foods when trying to reach a higher degree of pleasure. Interestingly, the current study agrees with our previous findings [10, 13] as well as with reports from other groups [11, 12] demonstrating that IUGR is indeed associated with an increased consumption of palatable foods at different times during the life-course. At age 24, women born severely growth restricted were shown to prefer to eat more carbohydrates and less protein than women born non-growth restricted, which was accompanied by an increased waist to hip ratio in this group [10]. Besides, people exposed to

undernutrition during early fetal stages (the Dutch Famine birth cohort) were more likely to consume a high-fat diet at middle age and had more pronounced hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and a twofold prevalence of coronary heart disease when compared to nonexposed individuals [11]. In another study involving a different sample of subjects exposed to the Dutch Famine in the first half of gestation, it was shown that they had higher reported absolute intakes of energy, fat, and protein and lower reported absolute intakes of carbohydrate than did the controls at middle age [12]. In addition, we recently showed that among children with normal birth weights, 3-year-old girls show a significantly greater ability to delay responding in a task using sweet as a reward when compared to boys. However, among IUGR girls, this ability to delay responding is lost. Furthermore, this impulsive responding at 36 months in girls predicts both increased consumption of palatable fat at 48 months of age and higher BMIs at 48 months of age [13]. Therefore, it seems that IUGR programs the hedonic response to palatable foods (such as sweet flavor), leading to an altered behavior when facing this type of foods that is seen already in childhood [13] and to an increased consumption in adult life [10–12]. The chronic increased ingestion of these aliments could, in the long term, lead to overweight, atherosclerosis, and cardiovascular disease already described in this group [4–9, 25, 26]. Alternatively, the altered response to the sweet taste in a critical period by itself programs the neural circuits responsible for the establishment of food preferences, leading to altered feeding choices in adult life in IUGR individuals. Considering that the taste reactivity facial reactions are homologous in humans and animals [15, 16], and therefore share underlying brain circuits, one could argue that IUGR programs the functioning of these circuits during fetal life. Berridge and coworkers have described “hedonic hotspots” in the nucleus accumbens and ventral pallidum that use opioid and

endocannabinoid signals to amplify the hedonic response for sweetness [27]. Microinjection of the opioid agonist DAMGO in these areas in rats causes sucrose taste to elicit over twice as many hedonic reactions as it normally does [27–30]. Similarly, microinjection of anandamide, which likely acts by stimulating the CB1 type of cannabinoid receptor, doubles the number of positive hedonic facial reactions that sucrose taste elicits from rats [29, 31]. Intrauterine growth restriction may decrease the sensitivity of these systems, by diminishing the action of the mu subtype of opioid receptor or the CB1 type of cannabinoid receptor, leading to a decrease in the hedonic response to the sweet taste. The apparent contradiction of less hedonic response early in life versus increased consumption in adulthood could be explained by a detachment of the normal close association between the hedonic value (or “liking”) and the incentive salience (or “wanting”). This could lead to motivated food consumption that is no longer hedonically driven by the activation of mesolimbic dopamine mechanisms of incentive salience, or even opioid circuits outside the hedonic hotspots. The suppression of positive hedonic reward systems or activation of dysphoric stress systems might prompt persistent attempts to use palatable food as a relief [32]. Our study has some limitations. Mainly, the small number of participants did not allow us to employ more adequate statistical adjustments (e.g., considering SES and gender in the analysis) and to classify the newborns into IUGR or non-IUGR categories. In addition, other components of the hedonic reaction could not be scored for the angle of the shooting performed. However, the correlation is very intense for a biological variable, especially considering that the study outline and the selection of participants were not primarily designed to test the current hypothesis. In conclusion, this is the first evidence of fetal programming of the hedonic response to the sweet taste in humans by IUGR. This takes on added significance considering that these

individuals also show a persistent preference for palatable foods later in life [10–12], as well as an increased risk for overweight and related metabolic and cardiovascular consequences [4–9, 25, 26]. Such group of evidence [33] could potentially bring enlightenment to future studies aiming primary prevention measures in this population.

References

- [1] C. N. Hales and D. J. P. Barker, “Type 2 (non-insulindependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis,” *Diabetologia*, vol. 35, no. 7, pp. 595–601, 1992.
- [2] T. Forsen, J. Eriksson, J. Tuomilehto, A. Reunanen, C. Osmond, and D. Barker, “The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 133, no. 3, pp. 176–182, 2000.
- [3] A. C. J. Ravelli, J. H. P. van der Meulen, R. P. J. Michels et al., “Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine,” *The Lancet*, vol. 351, no. 9097, pp. 173–177, 1998.
- [4] A. C. J. Ravelli, J. H. P. van der Meulen, C. Osmond, D. J. P. Barker, and O. P. Bleker, “Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally,” *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 70, no. 5, pp. 811–816, 1999.
- [5] G. P. Ravelli, Z. A. Stein, and M. W. Susser, “Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 295, no. 7, pp. 349–353, 1976.
- [6] K. Pilgaard, T. H. Mosbech, L. Grunnet et al., “Differential nongenetic impact of birth weight versus third-trimester growth velocity on glucose metabolism and magnetic resonance imaging abdominal obesity in young healthy twins,” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 96, pp. 2835–2843, 2011.
- [7] H. Bettiol, D. S. Filho, L. S. B. Haeffner et al., “Do intrauterine growth restriction and overweight at primary school age increase the risk of elevated body mass index in young adults?” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, no. 9, pp. 1237–1243, 2007.
- [8] T. J. Forsen, J. G. Eriksson, C. Osmond, and D. J. P. Barker, “The infant growth of boys who later develop coronary heart disease,” *Annals of Medicine*, vol. 36, no. 5, pp. 389–392, 2004.
- [9] R. C. Painter, S. R. De Rooij, P. M. Bossuyt et al., “Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine,” *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 84, no. 2, pp. 322–327, 2006.
- [10] M. A. Barbieri, A. K. Portella, P. P. Silveira et al., “Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women,” *Pediatric Research*, vol. 65, no. 2, pp. 215–220, 2009.
- [11] F. Lussana, R. C. Painter, M. C. Ocke, H. R. Buller, P. M. Bossuyt, and T. J. Roseboom, “Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile,” *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 88, no. 6, pp. 1648–1652, 2008.
- [12] A. D. Stein, A. Rundle, N. Wada, R. A. Goldbohm, and L. H. Lumey, “Associations of gestational exposure to famine with energy balance and macronutrient density of the diet at

- age 58 years differ according to the reference population used,” *Journal of Nutrition*, vol. 139, no. 8, pp. 1555–1561, 2009.
- [13] P. P. Silveira, M. Agranonik, H. Faras, A. K. Portella, M. J. Meaney, and R. D. Levitan, “Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype,” *Pediatric Research*, vol. 71, no. 3, pp. 293–298, 2012.
- [14] J. E. Steiner, “The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants,” in *Proceedings of the 4th Symposium on Oral Sensation and Perception*, vol. 4, pp. 254–278, 1973.
- [15] J. E. Steiner, D. Glaser, M. E. Hawilo, and K. C. Berridge, “Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates,” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 25, no. 1, pp. 53–74, 2001.
- [16] K. C. Berridge, “Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns,” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 24, no. 2, pp. 173–198, 2000.
- [17] F.W. Flynn, “Applications of taste reactivity to the study of the neural-hormonal controls of ingestive behavior,” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 109–120, 1995.
- [18] S. W. Kiefer, “Alcohol, palatability, and taste reactivity,” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 133–141, 1995.
- [19] J. Tonkiss, B. Shukitt-Hale, R. N. Formic, F. J. Rocco, and J.R. Galler, “Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats,” *Physiology and Behavior*, vol. 48, no. 5, pp. 675–680, 1990.
- [20] C. C. Johnston, R. Stremler, L. Horton, and A. Friedman, “Effect of repeated doses of sucrose during heel stick procedure in preterm neonates,” *Biology of the Neonate*, vol. 75, no. 3, pp. 160–166, 1999.
- [21] C. Celeste Johnston, F. Filion, L. Snider et al., “Routine sucrose analgesia during the first week of life in neonates younger than 31 weeks’ postconceptional age,” *Pediatrics*, vol. 110, no. 3, pp. 523–528, 2002.
- [22] H. J. Grill and R. Norgren, “The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats,” *Brain Research*, vol. 143, no. 2, pp. 263–279, 1978.
- [23] M. S. Kramer, R. Platt, H. Yang, H. McNamara, and R. H. Usher, “Are all growth-restricted newborns created equal(ly)?” *Pediatrics*, vol. 103, no. 3, pp. 599–602, 1999.
- [24] M. S. Kramer, R. W. Platt, S. W. Wen et al., “A new and improved population-based Canadian reference for birth weight for gestational age,” *Pediatrics*, vol. 108, no. 2, p. E35, 2001.
- [25] D. J. P. Barker, C. N. Martyn, C. Osmond, C. N. Hales, and C. H. D. Fall, “Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life,” *British Medical Journal*, vol. 307, no. 6918, pp. 1524–1527, 1993.
- [26] A. A. Davies, G. D. Smith, Y. Ben-Shlomo, and P. Litchfield, “Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25, 843 employees,” *Circulation*, vol. 110, no. 10, pp. 1258–1262, 2004.
- [27] S. Pecina, K. S. Smith, and K. C. Berridge, “Hedonic hot spots in the brain,” *Neuroscientist*, vol. 12, no. 6, pp. 500–511, 2006.
- [28] S. Pecina and K. C. Berridge, “Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness?” *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 50, pp. 11777–11786, 2005.
- [29] K. S. Smith, A. J. Tindell, J. W. Aldridge, and K. C. Berridge, “Ventral pallidum roles in reward and motivation,” *Behavioural Brain Research*, vol. 196, no. 2, pp. 155–167, 2009.

- [30] S. Pecina, "Opioid reward "liking" and "wanting" in the nucleus accumbens," *Physiology and Behavior*, vol. 94, no. 5, pp. 675–680, 2008. [31] S. V. Mahler, K. S. Smith, and K. C. Berridge, "Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances "liking" of a sweet reward," *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 11, pp. 2267–2278, 2007.
- [32] K. C. Berridge, "'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders," *Physiology and Behavior*, vol. 97, no. 5, pp. 537–550, 2009.
- [33] A. K. Portella, E. Kajantie, P. Hovi et al., "Effects of in utero conditions on adult feeding preferences," *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, vol. 3, no. 3, pp. 140–152, 2012.

APÊNDICE D – ARTIGO ENVIADO PARA REVISTA

Assessment for newborns methodology analyzing facial hedonic reactions

Caroline Ayres, Charles F. Ferreira, Juliana R. Bernardi, Thiago B. Marcelino,
Vânia N. Hirakata, Clécio H. da Silva, Marcelo Z. Goldani

ABSTRACT

This study describes the quantitative and qualitative methodology to assess the hedonic responses of the sweet stimulus in newborn. It was a descriptive, cross-sectional, observational study. The sample included healthy newborns, up to 24 hours of life, at 37-42 gestational weeks, vaginally born and breastfed before tests. The evaluation of the newborns reactions was performed by hedonic facial expressions analysis, characterized by facial expressions with rhythmic serial tongue protrusion after neutral or sweet solution intake. Initially, 1 mL of water solution (neutral solution) was provided to the newborn, followed by a 1 minute long recording. After, the same amount of sucrose 25% solution was provided, performing a second recording with the same duration. The concordance between researchers was analyzed by Bland-Altman statistical method. A total of 100 newborns (n=49 male, n=51 female, lifetime mean=15h12min±6h29min) were recorded for neutral and sucrose solution intake, totaling 200 videos. These videos were double blind analyzed and the test revealed a 90% concordance between the two-trained researchers, in relation to both neutral and to sucrose solutions. The intraclass correlation coefficient was 0.99 for both substances, with a significant increase in hedonic expressions frequencies after sucrose solution intake. These results confirm that the proposed test has an efficient power to detect significant differences between taste stimuli. In conclusion,

this evaluation method of hedonic facial reactions in newborns reflects the response for a specific taste.

Keywords: Newborn; Hedonic facial reaction; Sucrose solution.

INTRODUCTION

The development of eating behavior in childhood can be influenced by several and complex factors, such as genetic inheritance (Col Araz et al., 2012), nutrients availability (Kersten, Laraia, Kelly, Adler, & Yen, 2012), family eating habits (Scaglioni, Salvioni, & Galimberti, 2008), sensitivity to taste (Lipchock, Reed, & Mennella, 2012; Mennella, Pepino, & Reed, 2005; Sharma & Kaur, 2014) and perinatal events (Ayres et al., 2012; Portella et al., 2012). The early childhood food habits in a behavioral perspective can be influenced by the mode of milk feeding, the complementary feeding practices and others eating behaviors reported influencing later eating patterns (Nicklaus and Remy, 2013). Therefore, eating habits in childhood can reflect intake in adulthood and may be related to the risk of developing chronic diseases, such as obesity and cardiovascular outcomes (Bahadoran, Mirmiran, Golzarand, Hosseini-Esfahani, & Azizi, 2012; Kollias et al., 2011; Rouhani, Mirseifinezhad, Omrani, Esmailzadeh, & Azadbakht, 2012).

Affective reactions reflect the quality of pleasant or unpleasant events (Berridge, 2003). The child has essentially two patterns of facial expressions to taste: positive emotional reaction – hedonic, or negative emotional reaction – disgust. The sweet taste of sugar usually draws positive affective patterns, such as lip-shaped “nozzle” and rhythmic series of tongue protrusion movements. These movements are accompanied by relaxation of facial muscles (Steiner et al., 2001). Some studies reported that the experience to a taste during intrauterine life could improve the acceptance of foods with the same taste in childhood (Beauchamp & Mennella, 2009; Mennella, 2009; Mennella, Griffin, & Beauchamp, 2004; Mennella, Jagnow, & Beauchamp, 2001; Mennella, Johnson, & Beauchamp, 1995).

The automatic responses to stimulus can be innate, such as in sweet taste (Beauchamp & Moran, 1982), and may change during life course, depending on the type of exposure in utero phase, among other factors before and after birth (Lukasewycz & Mennella, 2012;

Mennella, 2009; Mennella, Forestell, Morgan, & Beauchamp, 2009). The child's facial expression for a sweet taste is an example of a positive affective reaction behavior (Steiner, 1973; Steiner, Glaser, Hawilo, & Berridge, 2001).

There are different methods in the literature to evaluate the hedonic responses to gustatory stimuli in children. Steiner was pioneered in studies about affective reactivity when published illustrated of the facial reactions in newborns evoked by the sweet, salty, sour and bitter taste (Steiner, 1973; Steiner, 1974). Crook et al., (1976) conducted four experiments about the effects of brief intraoral fluid stimulation upon the nonnutritive sucking rhythm of newborn infants. In 1982, the authors studied the sucrose preference at birth determined by allowing ad libitum consumption of sucrose solutions and water during brief presentations, according to the dietary record (Beauchamp 1982). Researchers used the method to taste reactivity demonstrated that sucrose provoked positive or hedonic standards as lip smacking and rhythmic series of tongue protrusion, accompanied by relaxation of the facial muscles and an occasional smile (Berridge, 2000; Smith and Berridge, 2007; Steiner et al., 2001). The study of Rosenstein & Oster (1988) was evaluated videotaped facial expressions based in Facial Action Coding System adapted for infants (Baby FACS) evoked by sucrose, sodium chloride, citric acid and quinine hydrochloride. Ganchrow et al., 1983 evaluated facial expressions recorded by video of newborns after oral stimulation with distilled water and sucrose, urea and quinine hydrochloride. Another method use in literature was "latex nipple sweetened with sucrose" (Maone et al., 1990). Porges and Lipsitt, (1993) evaluate the gustatory-vagal hypothesis with the neonatal responsivity to gustatory stimulation.

In addition, the hedonic expressions reflect the activity of specific mesolimbic system (Peciña, Smith, & Berridge, 2006), which are also activated after tasty food visualization (Volkow & Fowler, 2000). As variations in this circuit responsiveness may

predict the risk for weight gain (Stice, Yokum, Bohon, Marti, & Smolen, 2010), behavioral alterations could also mean a risk for overeating and/or overweight in the future.

In this sense, this research aimed to describe the quantitative and qualitative methodology able to assess the hedonic responses of the sweet stimulus in healthy newborn.

METHODS

This is a cross-sectional, observational study, to presents a methodology, based in Berridge (2000), Steiner (2001), to assess the facial reactions to sweet taste. The same method of positive hedonic reactions scores was published previously (Ayres et al., 2012). We used data collected from November 2010 to May 2012, in Hospital Nossa Senhora da Conceição, which assists the Public Health System (Sistema Único de Saúde - SUS). This hospital is located in Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul state, in Southern Brazil.

The convenience sample included only healthy newborns, up to 24 hours of life, at 37-42 gestational weeks, vaginal delivery and breastfed before the testing time. Children of mothers who did not sign the informed consent, cases of maternal diseases (e.g. diabetes, hypertension, HIV) and those who were not exclusively breastfed were excluded from sample. Maternal and newborns' data were collected from medical records, prenatal child health handbook.

All procedures performed in this study involved human participants and were in accordance with the ethical standards of Research Ethics Committee of the Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC, protocol number 10-047) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments of comparable ethical standards.

Procedures

Hedonic reactions or positive emotional facial reactions

The newborns' positive affective facial reactions assessments were performed by hedonic facial expression analysis, characterized by serial and rhythmic tongue protrusion through fresh or neutral substances intake (Steiner, 1973; 1974; Steiner et al., 2001).

First, one milliliter (1mL) of deionized water solution (called neutral solution) was provided to the newborn, recording all reactions lasting 1 minute. After, 1mL of water + 25% sucrose solution (see below) was provided to perform the second 1-minute record. Shortly, we

emphasize that neutral solutions were firstly provided to all newborns, being sucrose solution shootings performed only after neutral solution testing. All solutions were administered orally, pressing lightly the newborn masseter muscle, opening their mouths and allowing the release of the substance by a single bottle pressure.

The newborn facial expression, during the test times, were recorded continuously through one minute lasting shot, with a 20 centimeter distance between the camera and the newborn, under natural light insight the hospital room. All hospital rooms presented from two to four beds.

A Sony Cyber-Shot DSC-S500 camera (Sony®), with 6.0 mega pixels and 30 frames per second, was used for recording all tests. The newborn was placed in a comfortable position, without crying, with their mother near them. After the test, mothers were oriented towards the practice of newborn oral care, as well as encouraged to practice exclusive breastfeeding through explanations of its importance and benefits for both, mother and baby.

Substances

Deionized water was used as a neutral substance and the sweet substance was a water + 25% sucrose solution (designed fresh solution), composed by 1mL of deionized water containing 0.25g of sucrose (modified from Ayres et al., 2012 and Steiner et al., 2001). All substances were produced by a compounding pharmacy selected by its quality standards adopted in solutions preparations.

The deionized water was subject through three purification processes: dirt removal, bacteria elimination and total elimination of micronutrients. All substances were daily morning produced and delivered in the same morning day, whereas data collection was performed in the afternoon of that day. In this time interval, all solutions were kept under refrigeration at 2°C to 8°C, with no preservative solutions mixture to them, being their valid

restricted to 24 hours after preparation. All solutions were discarded if not used during this period interval.

The substances packaging happened individually, in a bottle dropper, labeled with the name of the substance, quantity (1mL), expiry date, sealed and wrapped in a plastic bag sealed also with a sealing.

All vials were opened in the presence of the mother, immediately prior to testing. The daily used substances were displayed in a cooler, in a heat pack, separated by the type of substance. At testing time the substances were at room temperature, between 15°C to 25°C.

Videos analysis

All 1-minute videos were first analyzed at a normal speed by two trained researchers. These analyses were performed to verify whether there were hedonic facial expressions during the recorded 1 minute. Later, all records were evaluated frame by frame using Windows Media Player program (Microsoft®), slowing the speed to better detect hedonic facial expressions. Every second were composed by 30 frames, compounding 1800 frames per 60 seconds. The frequency of facial reactions in 2 seconds intervals was recorded for 1 minute of continuous shooting. Facial expressions representing hedonic reactions or positive affective reactions were considered. For each hedonic facial expression or tongue protrusion, for example, a frequency was registered. For these results analysis, the sum of all 60 seconds records were calculated (Berridge, 2000; Steiner et al., 2001).

Hedonic reactions were characterized by facial expressions like lips suctions and rhythmic movements of tongue protrusion (Steiner, 1973). Videos were double-blinded analyzed by two trained researchers, both trained by another researcher that had already used this technique.

Sample size estimation

Martin Bland and Doug Altman, authors of the statistical test to assess agreement between evaluators (concordance analysis between Bland-Altman methods), state that for an adequate accuracy it is important to evaluate 100 individuals, corresponding to a 95% confidence interval and 0.34 standard deviations of error (SD) (Bland & Altman, 1986, 1999, 2012).

Statistical methods

Symmetric data were expressed as mean and standard deviation (SD) and asymmetric data were expressed as median and interquartile ranges. To evaluate the agreement between the two raters, a concordance between Bland-Altman method was applied.

The methodology, initially proposed by Bland and Altman, evaluate the correlation between two variables (X and Y) starts from a graphical view from a scatter plot for the two variable difference (X-Y) and the average of them (X+Y/2). In this chart we are able to see the bias (how the differences deviate from zero), the error (dispersion of the points around the mean), the outliers and possible trends (Bland & Altman, 1986, 1999, 2012).

For complementing these analyses, an intra-class coefficient (ICC) was also applied. To compare the hedonic facial expressions frequency, values evoked by water and sucrose solutions were analyzed by Wilcoxon test. All data were evaluated using Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 18.0. The level of significance was set at 5% for all analyzes.

RESULTS

A total of 100 newborns were recorded for neutral and sucrose solution intake, generating 200 videos. Figure 1 displays four newborns sequences for neutral (Figure 1A) and sucrose (Figure 1B) solutions.

The newborns average life was 15.12 ± 6.29 hours and minutes. Among the 100 newborns evaluated, 49% were male and 51% female. Birth weight average was 327.49 ± 439.85 grams, with 39 ± 1 weeks of gestational age. Maternal age mean was 23 ± 6 years.



Figure 1. Newborn facial expressions. A. Newborn facial expression to neutral solution. B. Tongue protrusion, newborn facial expression designed hedonic reaction when performed in rhythmic series.

The Bland-Altman test indicated agreement between researchers, both in relation to water substance (Figure 2) and to sucrose solution (Figure 3). Through

95% agreement limits, we observed that there was an agreement in more than 90% of our data.

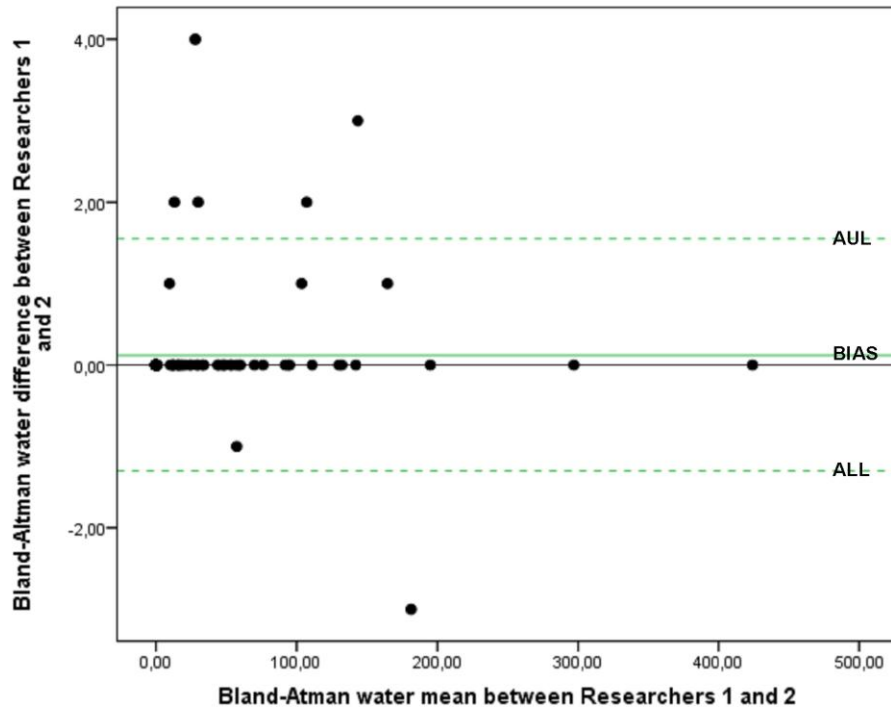


Figure 2. Bland-Altman dispersion chart representing inter rater agreement in relation to neutral substance. AUL: Agreement upper limit. ALL: Agreement lower limit.

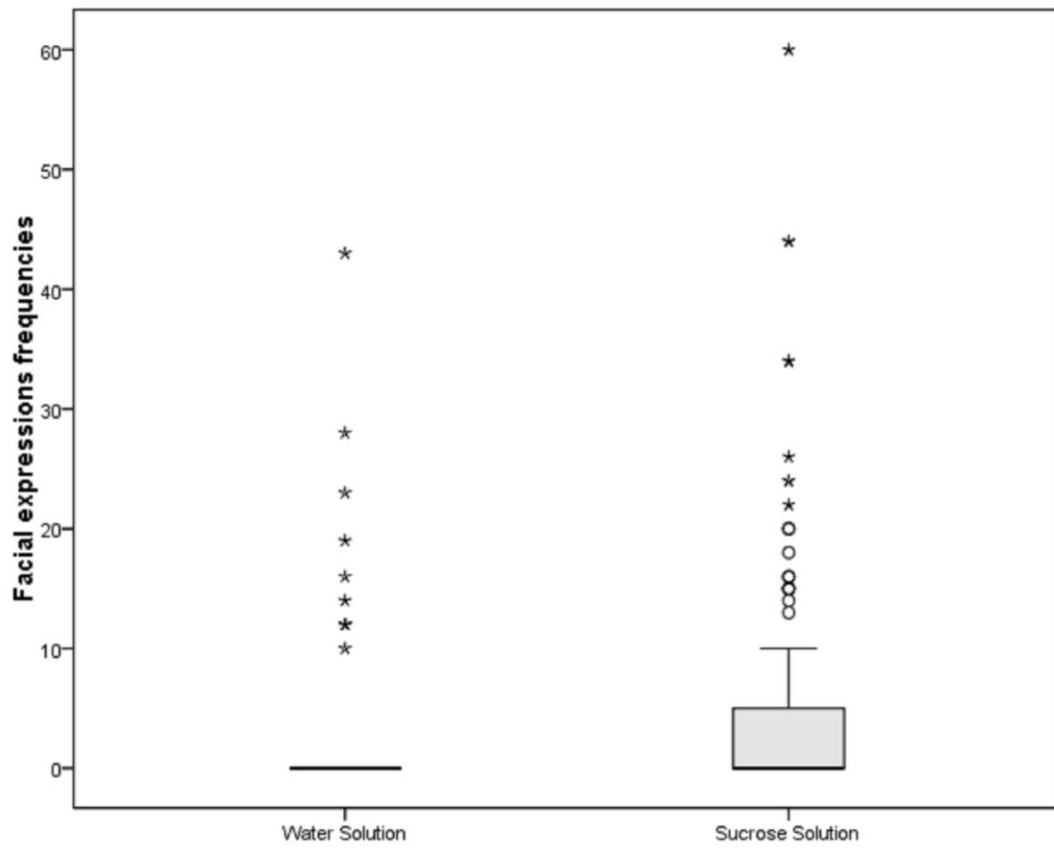


Figure 4. Hedonic facial expressions frequency in response to water or sucrose solutions. Hedonic facial frequencies were increased in response to sucrose solution, compared to neutral substance ($p=0.004$).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report showing an assessment method description for newborns affective facial reactions through sweet taste stimulus involving recorded facial expression analysis. We observed that the sweet substance evokes hedonic reactions in infants and that facial expression is an important measure to evaluate possible hedonic responses. The statistical interrater agreement confirms that this method is an effective protocol for measuring the hedonic impact of sweet taste in newborns. Additionally, Mennella et al. described that fetuses exhibit hedonic responses through facial expressions for tastes, even before birth (Mennella et al., 1995).

Some researchers recorded facial expressions from photographs, thus analyzing affective reactions of infants and animals (Steiner, 1973, 1974). With technology availability, researchers are able to record facial expressions through recording, which allows an accurately assessment of facial expressions variables (e.g. frequency, duration), such as hedonic and aversive reactions. Furthermore, our method allows reducing the video speed and evaluating parameters frame by frame. It is also possible to identify hedonic responses to taste stimuli in rodents and primates, using laboratory rats or primates the reactivity taste test, allows managing the applied solutions (e.g. neutral, sweet, sour or other) at different concentrations and recording their facial expressions (Berridge, 2000; Steiner et al., 2001).

After that, some authors have already studied newborn sucrose, suggesting that early experience to sweetened water intake could maintain a preference for sucrose solutions later in life (Beauchamp & Moran, 1982). These expressions induced by tastes produce feelings, being this parameter referred only for taste quality, not measuring its intensity. Facial expressions are affective reactions for a specific taste hedonic impact/response, reflecting the pleasure feeling to a particular taste. Additionally, it is not possible to assess the substance offered only by its sensory quality. A salty taste, for example, can extract a positive reaction in

the same way that a sweet taste. On the other hand, a sour, a bitter or a very salty taste could extract similar negative reactions. However, a trained researcher could assess if a child liked a taste based on facial expression, considering this as a positive (hedonic) or negative (aversive) reaction (Berridge, 2000).

Schwartz et al. (2009) assessed the acceptance of tastes and their developmental changes over the first year, compared to acceptance for all tastes and reactivity to the overall flavor. Acceptance tastes sweet, salty, bitter, sour and umami were evaluated in three groups of forty-five subjects with ages of 3, 6 and 12 months. Acceptance during the first year only evolved into sweet and salty taste like. In every age, sweet and salty foods were the most preferred taste. Facial reactions to umami were neutral. Sour and bitter tastes were the least accepted. By improving the knowledge of evolution to accept a certain taste contributes to better understand feeding behavior in childhood that reflects the eating behavior in adulthood.

Focusing on the study of facial expressions, studies have shown that some taste components universal facial cause reactions among all primates such as "gapes" for bitter or series of rhythmic protrusion of tongue for sweet (Steiner et al., 2001; Berridge 2000; Smith e Berridge, 2007). Another study aimed to compare the facial responses to tastes among newborns of women with and without gestational diabetes mellitus. The tastes were evaluated by the glucose administration, sodium chloride, citric acid and quinine hydrochloride; 0.2 ml of solution over the dorsal surface of the tongue. The newborns had their faces filmed and facial responses were coded according to the FACS Baby adapted. Newborns of mothers with gestational diabetes mellitus seem to have a little taste preference salt (Sa et al., 2014)

on sweet tastes appetite in newborns (Beauchamp & Mennella, 2009; Beauchamp & Moran, 1982; Mennella et al., 2004; Mennella et al., 2001).

Studies investigated the neural basis for sensory pleasure related to food, designating some brain sub-regions as “hedonic hotspots”, which are encephalic areas capable of amplifying causally positive affective reactions to sweet tastes in response to certain neurobiological and neurochemical stimuli (e.g. orexin, opioids, palatable foods and sweet tastes), generating “liking” or “pleasured” feelings (Castro & Berridge, 2014b; Ho & Berridge, 2013; Peciña et al., 2006). These hedonic mechanisms are, at least, partially distinct from mesocorticolimbic circuitry, a biological pathway that generates motivation for eating and the “wanting” feeling (Castro & Berridge, 2014a, 2014b). This current evidence suggests that the “hedonic hotspots” exist in limbic brain structures, being capable of increasing the hedonic impact of natural sensory rewards, like palatable and sweet tastes. In this sense, these access points are found in nucleus accumbens (particularly its medial shell area) (Castro & Berridge, 2014a, 2014b), ventral pallidum (Ho & Berridge, 2013, 2014; Simmons et al., 2014) and parabrachial nucleus (Castro & Berridge, 2014a). Besides, some regions could amplify the sweet hedonic impact, expressing increased “liking/pleasure” reactions for sucrose taste (Ho & Berridge, 2013).

As reported by Kringelbach & Berridge (2010), eating behavior is one of the basic life pleasures, which could be modulated by what we eat or enjoy in different ways (e.g. like and dislike). These personal differences are linked to individual learning of liking and disliking a specific taste, with innate preference predisposed to the basic tastes. Additionally, some extrinsic, intrinsic and individual factors may contribute to some taste preference, associated on subjective experiences or modulated by hunger/satiety states (Cabanac, 1971; Small et al., 2001). This subjective taste perception is produced by different signals to Central Nervous System areas (for an overview, Small, 2012; 2006; Grabenhorst et al., 2007; Kringelbach &

Radcliffe, 2005; Small et al., 2003; O'Doherty et al., 2001). Taken together, these data support important information focusing on Central Nervous System taste preference representation.

An affective reactivity to taste as a tool for measuring hedonic functions by test could be used as an useful and objective tool for measurement of liking/pleasure hedonic reactions in response to palatable food, based on the quantification of different taste induced orofacial affective reactions (Steiner et al., 2001).

CONCLUSIONS

The proposed evaluation method of hedonic facial reactions in infants reflects the hedonic impact for this specific taste, allowing this methodology to be applied in early life (e.g. newborn), but already responsive stages. Whereas these hedonic responses through facial expressions are based on the reported authors, we could speculate that hedonic responses through facial expressions are related to taste pleasure feeling, allowing this direct relation being interpreted as a greater food consumption of this taste type later in life.

It is necessary more knowledge concerning on this neural pleasure/reward appetite controlled circuitry relationship, since it is capable of modifying food intake by “liking/pleasure” responses to foods or tastes, without considering the nutritional balance or nutritional needs. As reward pathways are involved, other pleasurable stimuli may replace the specific food consumption that acts through these routes, as palatable foods.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil). We thank the children and families for their participation, which made this research possible. We also thank the Grupo Hospitalar Conceição (GHC) research team.

REFERENCES

Avena, N. M., Rada, P., & Hoebel, B. G. (2009). Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *J Nutr*, 139(3), 623-628. doi: 10.3945/jn.108.097584

Ayres, C., Agranonik, M., Portella, A. K., Filion, F., Johnston, C. C., & Silveira, P. P. (2012). Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr*, 2012, 657379. doi: 10.1155/2012/657379

Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Golzarand, M., Hosseini-Esfahani, F., & Azizi, F. (2012). Fast food consumption in Iranian adults; dietary intake and cardiovascular risk factors: Tehran Lipid and Glucose Study. *Arch Iran Med*, 15(6), 346-351. doi: 012156/AIM.006

Beauchamp, G. K., & Mennella, J. A. (2009). Early flavor learning and its impact on later feeding behavior. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 48 Suppl 1, S25-30. doi: 10.1097/MPG.0b013e31819774a5

Beauchamp, G. K., & Moran, M. (1982). Dietary experience and sweet taste preference in human infants. *Appetite*, 3(2), 139-152.

Berridge, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev*, 24(2), 173-198.

Berridge, K. C. (2003). Pleasures of the brain. *Brain Cogn*, 52(1), 106-128.

Black, R. E., Victora, C. G., Walker, S. P., Bhutta, Z. A., Christian, P., de Onis, M., . . . Group, M. a. C. N. S. (2013). Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet*, 382(9890), 427-451. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60937-X

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1(8476), 307-310.

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*, 8(2), 135-160.

Bland, J. M., & Altman, D. G. (2012). Agreed statistics: measurement method comparison. *Anesthesiology*, 116(1), 182-185. doi: 10.1097/ALN.0b013e31823d7784

Castro, D. C., & Berridge, K. C. (2014a). Advances in the neurobiological bases for food 'liking' versus 'wanting'. *Physiol Behav*, 136, 22-30. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.022

Castro, D. C., & Berridge, K. C. (2014b). Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness "liking" and "wanting". *J Neurosci*, 34(12), 4239-4250. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4458-13.2014

Col Araz, N., Nacak, M., Oguzkan Balci, S., Benlier, N., Araz, M., Pehlivan, S., . . . Aynacioglu, A. S. (2012). Childhood obesity and the role of dopamine D2 receptor and cannabinoid receptor-1 gene polymorphisms. *Genet Test Mol Biomarkers*, 16(12), 1408-1412. doi: 10.1089/gtmb.2012.0244

Crystal, S. R., & Bernstein, I. L. (1998). Infant salt preference and mother's morning sickness. *Appetite*, 30(3), 297-307. doi: 10.1006/appe.1997.0144

Davis, M. E., & Potter, E. L. (1946). Intrauterine respiration of the human fetus. *J Am Med Assoc*, 131(15), 1194-1201.

Ho, C. Y., & Berridge, K. C. (2013). An orexin hotspot in ventral pallidum amplifies hedonic 'liking' for sweetness. *Neuropsychopharmacology*, 38(9), 1655-1664. doi: 10.1038/npp.2013.62

Ho, C. Y., & Berridge, K. C. (2014). Excessive disgust caused by brain lesions or temporary inactivations: mapping hotspots of the nucleus accumbens and ventral pallidum. *Eur J Neurosci*, 40(10), 3556-3572. doi: 10.1111/ejn.12720

Kersten, E., Laraia, B., Kelly, M., Adler, N., & Yen, I. H. (2012). Small food stores and availability of nutritious foods: a comparison of database and in-store measures, Northern California, 2009. *Prev Chronic Dis*, 9, E127.

Kollias, A., Skliros, E., Stergiou, G. S., Leotsakos, N., Saridi, M., & Garifallos, D. (2011). Obesity and associated cardiovascular risk factors among schoolchildren in Greece: a cross-sectional study and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 24(11-12), 929-938.

Kubo, T., Furujo, M., Ueda, Y., Imai, K., Tsukahara, K., Morita, H., . . . Shiraga, H. (2008). Predicting obesity in early adulthood in Japanese women. *J Paediatr Child Health*, 44(1-2), 33-37. doi: 10.1111/j.1440-1754.2007.01166.x

Kudlová, E., & Schneidrová, D. (2012). Dietary patterns and their changes in early childhood. *Cent Eur J Public Health*, 20(2), 126-134.

Levine, A. S., Kotz, C. M., & Gosnell, B. A. (2003). Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance. *Am J Clin Nutr*, 78(4), 834S-842S.

Lipchock, S. V., Reed, D. R., & Mennella, J. A. (2012). Relationship between bitter-taste receptor genotype and solid medication formulation usage among young children: a retrospective analysis. *Clin Ther*, 34(3), 728-733. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.02.006

Lukasewycz, L. D., & Mennella, J. A. (2012). Lingual tactile acuity and food texture preferences among children and their mothers. *Food Qual Prefer*, 26(1), 58-66. doi: 10.1016/j.foodqual.2012.03.007

Mennella, J. A. (2009). Flavour programming during breast-feeding. *Adv Exp Med Biol*, 639, 113-120. doi: 10.1007/978-1-4020-8749-3_9

Mennella, J. A., Forestell, C. A., Morgan, L. K., & Beauchamp, G. K. (2009). Early milk feeding influences taste acceptance and liking during infancy. *Am J Clin Nutr*, 90(3), 780S-788S. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462O

Mennella, J. A., Griffin, C. E., & Beauchamp, G. K. (2004). Flavor programming during infancy. *Pediatrics*, 113(4), 840-845.

Mennella, J. A., Jagnow, C. P., & Beauchamp, G. K. (2001). Prenatal and postnatal flavor learning by human infants. *Pediatrics*, 107(6), E88.

Mennella, J. A., Johnson, A., & Beauchamp, G. K. (1995). Garlic ingestion by pregnant women alters the odor of amniotic fluid. *Chem Senses*, 20(2), 207-209.

Mennella, J. A., Pepino, M. Y., & Reed, D. R. (2005). Genetic and environmental determinants of bitter perception and sweet preferences. *Pediatrics*, 115(2), e216-222. doi: 10.1542/peds.2004-1582

Peciña, S., Smith, K. S., & Berridge, K. C. (2006). Hedonic hot spots in the brain. *Neuroscientist*, 12(6), 500-511. doi: 10.1177/1073858406293154

Pepino, M. Y., & Mennella, J. A. (2012). Habituation to the pleasure elicited by sweetness in lean and obese women. *Appetite*, 58(3), 800-805. doi: 10.1016/j.appet.2012.01.026

Portella, A. K., Kajantie, E., Hovi, P., Desai, M., Ross, M. G., Goldani, M. Z., . . . Silveira, P. P. (2012). Effects of in utero conditions on adult feeding preferences. *J Dev Orig Health Dis*, 3(3), 140-152. doi: 10.1017/S2040174412000062

Rouhani, M. H., Mirseifinezhad, M., Omrani, N., Esmailzadeh, A., & Azadbakht, L. (2012). Fast Food Consumption, Quality of Diet, and Obesity among Isfahanian Adolescent Girls. *J Obes*, 2012, 597924. doi: 10.1155/2012/597924

Scaglioni, S., Salvioni, M., & Galimberti, C. (2008). Influence of parental attitudes in the development of children eating behaviour. *Br J Nutr*, 99 Suppl 1, S22-25. doi: 10.1017/S0007114508892471

Schaal, B., Marlier, L., & Soussignan, R. (2000). Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. *Chem Senses*, 25(6), 729-737.

Sharma, K., & Kaur, G. K. (2014). PTC bitter taste genetic polymorphism, food choices, physical growth in body height and body fat related traits among adolescent girls from Kangra Valley, Himachal Pradesh (India). *Ann Hum Biol*, 41(1), 29-39. doi: 10.3109/03014460.2013.822929

Simmons, W. K., Rapuano, K. M., Ingeholm, J. E., Avery, J., Kallman, S., Hall, K. D., & Martin, A. (2014). The ventral pallidum and orbitofrontal cortex support food pleasantness inferences. *Brain Struct Funct*, 219(2), 473-483. doi: 10.1007/s00429-013-0511-0

Steiner, J. E. (1973). The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants. *Symp Oral Sens Percept*(4), 254-278.

Steiner, J. E. (1974). Discussion paper: innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. *Ann N Y Acad Sci*, 237(0), 229-233.

Steiner, J. E., Glaser, D., Hawilo, M. E., & Berridge, K. C. (2001). Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(1), 53-74.

Stice, E., Yokum, S., Bohon, C., Marti, N., & Smolen, A. (2010). Reward circuitry responsivity to food predicts future increases in body mass: moderating effects of DRD2 and DRD4. *Neuroimage*, 50(4), 1618-1625. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.01.081

Strauss, R. (1999). Childhood obesity. *Curr Probl Pediatr*, 29(1), 1-29.

Volkow, N. D., & Fowler, J. S. (2000). Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*, 10(3), 318-325.