

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

-

UNIVERSIDADE DE NANTES
ESCOLA DE DOUTORADO EM BIOLOGIA-SAÚDE

GABRIEL ARAÚJO TAVARES

CONTROLE CENTRAL DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS: Efeitos
do desmame precoce e da suplementação oral aguda de
miR-320-3p e miR-375-3p durante o período pós-natal

Recife
2021

GABRIEL ARAÚJO TAVARES

CONTROLE CENTRAL DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS: Efeitos
do desmame precoce e da suplementação oral aguda de
miR-320-3p e miR-375-3p durante o período pós-natal

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Nutrição
da Universidade Federal de Pernambuco e
à Escola de Doutorado em Biologia-Saúde
da Universidade de Nantes como requisito
parcial para obtenção do grau de doutor
em Nutrição. Área de concentração: Bases
experimentais da nutrição.

Orientadores: Dra. Sandra Lopes de Souza e Dr. Bertrand Kaeffer

Co-orientadora: Dra. Renata Cristinny de Farias Campina

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Elaine Freitas, CRB4: 1790

T231c

Tavares, Gabriel Araújo

Controle central do comportamento alimentar em ratos: efeitos do desmame precoce e da suplementação oral aguda de miR-320-3p e miR-375-3p durante o período pós-natal/ Gabriel Araújo Tavares. – 2021.
127 f.; il., tab.

Orientadores: Sandra Lopes de Souza e Bertrand Kaeffer

Coorientadora: Renata Cristinny de Farias Campina.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição/ Universidade de Nantes, Escola de Doutorado em Biologia-Saúde. Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Comportamento alimentar. 2. Desmame precoce. 3. Dopamina. 4. microRNA. 5. Serotonina. I. Souza, Sandra Lopes de (orientadora). II. Kaeffer, Bertrand (orientador). III. Campina, Renata Cristinny de Farias (coorientadora). IV. Título.

613 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2021 - 104)

GABRIEL ARAÚJO TAVARES

CONTROLE CENTRAL DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS: Efeitos
do desmame precoce e da suplementação oral aguda de
miR-320-3p e miR-375-3p durante o período pós-natal

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Nutrição
da Universidade Federal de Pernambuco e
à Escola de Doutorado em Biologia-Saúde
da Universidade de Nantes como requisito
parcial para obtenção do grau de doutor
em Nutrição. Área de concentração: Bases
experimentais da nutrição.

Aprovada em: 13/04/2021

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Sandra Lopes de Souza
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Bertrand Kaeffer
Université de Nantes

Profa. Dra. Khadija Ouguerram
Université de Nantes

Dra. Hanna Taipaleenmäki
University Medical Center Hamburg-Eppendorf

Dr. Alberto Davalos
Madrid Institute for Advanced Study

RESUMO

O desmame precoce é um tipo de estresse precoce que está associado com alterações do comportamento alimentar. Apesar disso, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares e epigenéticos dentro desse contexto. Adicionalmente, a comunidade científica tem lançado esforços para encontrar estratégias de prevenção de problemas do desenvolvimento associados ao estresse precoce. Neste contexto, a utilização terapêutica de microRNAs tem se destacado. Desta forma, este estudo buscou avaliar os efeitos do desmame precoce sobre parâmetros comportamentais, moleculares e epigenéticos do controle do comportamento alimentar, além do possível efeito preventivo da suplementação pós-natal aguda com miR-320-3p e miR-375-3p. Para isto, dois desenhos experimentais foram elaborados. No primeiro, foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas submetidos ao desmame regular (D30) ou precoce (D15). Entre 250 a 300 dias de vida, estes animais tiveram avaliados a sua massa corporal, ingestão alimentar de 24h, por fases do ciclo circadiano, em resposta à privação alimentar e de alimento palatável. Além disso, foram avaliados o peso do fígado, da gordura abdominal, níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, glicose e expressão gênica de SERT, 5HT1B, 5HT2C, DRD1, DRD2, NPY e POMC no hipotálamo e tronco encefálico através de PCR em tempo real. No segundo experimento, ratos *Sprague-Dawley knock-in* para GFP na região promotora da CCK foram submetidos ao desmame regular (D30) ou precoce (D15), além de terem recebido suplementação oral de miR-320-3p (D30 e D15) ou miR-375-3p (D30) embebidos em DOSP no dia pós-natal 12. Aos 45 dias de vida, animais de ambos os sexos foram eutanasiados e foram coletados o hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico, onde foi avaliada através de PCR em tempo real a expressão dos genes SERT, 5HT1B, 5HT2C, DRD1, DRD2, CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, GFP e CCK, e dos microRNAs miR-375-3p, miR-320-3p, miR-132-3p, miR-504 e miR-16-5p. O desmame precoce promoveu hiperfagia e aumento de ingestão de alimento palatável em machos, porém hipofagia em fêmeas. A expressão de 5HT1B, 5HT2C, SERT, DRD1 e DRD2 foi aumentada no tronco encefálico dos machos, além de no hipotálamo serem observados elevada expressão de SERT e DRD1 e expressão diminuída de 5HT1B e POMC. Apesar de na maioria dos casos os efeitos da suplementação de miR-320-3p exercer efeitos semelhantes ao desmame precoce, esta preveniu efeitos do desmame precoce sobre o aumento de miR-16-5p no

hipotálamo de fêmeas, aumento de DRD1 no tronco encefálico de machos e aumento de CLOCK no hipocampo de fêmeas. A suplementação de miR-375-3p aumentou a expressão de miR-320-3p no hipotálamo; reduziu a expressão de todos os mRNAs avaliados no hipotálamo, exceto DRD1 e CCK; e reduziu a expressão de 5HT1B, 5HT2C, DRD1, CLOCK, BMAL1, PER1 e PER2 e CCK no hipocampo de fêmeas e de CCK no hipocampo de machos. Assim, concluímos que o desmame precoce altera o comportamento alimentar e a expressão de componentes dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico em longo prazo. Adicionalmente, a suplementação de miR-320-3p e miR-375-3 apresentou resultados promissores como estratégia de prevenção às modificações promovidas pelo desmame precoce, apesar de também apresentar resultados semelhantes ao desmame precoce.

Palavras-chave: Comportamento alimentar. Desmame precoce. Dopamina; MicroRNA; Serotonina.

ABSTRACT

Early weaning is a type of early stress that is associated with changes in eating behavior. Despite this, little is known about the molecular and epigenetic mechanisms within this context. Additionally, the scientific community has launched efforts to find strategies for preventing developmental problems associated with early stress. In this context, the therapeutic use of microRNAs has stood out. Thus, this study sought to evaluate the effects of early weaning on behavioral, molecular and epigenetic parameters of the central control of eating behavior, in addition to the possible preventive effect of acute postnatal supplementation with miR-320-3p and miR-375-3p. For this, two experimental designs were elaborated. In the first, male and female *Wistar* rats submitted to regular (D30) or early (D15) weaning were used. Between 250 and 300 days of life, these animals had their body mass, food intake of 24 hours, by phases of the circadian cycle, in response to food deprivation and palatable food evaluated. In addition, we measured the liver weight, abdominal fat weight, serum triglyceride levels, total cholesterol, serum glucose, and gene expression of SERT, 5HT1B, 5HT2C, DRD1, DRD2, NPY and POMC in the hypothalamus and brain stem were evaluated using Real-time PCR. In the second experiment, *Sprague-Dawley* rats knock-in for GFP in the CCK promoter region were submitted to regular (D30) or early (D15) weaning, in addition to receiving oral supplementation of miR-320-3p (D30 and D15) or miR-375-3p (D30) soaked in DOSP on the postnatal day 12. At 45 days of age the animals were euthanized and the hypothalamus, hippocampus and brain stem were collected, where gene expression was evaluated using RT-PCR for SERT, 5HT1B, 5HT2C, DRD1, DRD2, CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, GFP and CCK, and the microRNAs miR-375-3p, miR-320-3p, miR-132-3p, miR-504 and miR-16-5p. Early weaning promoted hyperphagia and increased palatable food intake in males, but hypophagia in females. The expression of 5HT1B, 5HT2C, SERT, DRD1 and DRD2 was increased in the male brain stem, in addition to the high levels of SERT and DRD1 and decreased expression of 5HT1B and POMC in the hypothalamus. Although in most cases the effects of miR-320-3p supplementation have similar effects to early weaning, it prevented effects of early weaning on the increase of miR-16-5p in the female hypothalamus, increase of DRD1 in the brain stem of males and increase of CLOCK in the female hippocampus. The supplementation of miR-375-3p increased the expression of miR-320-3p in the hypothalamus; reduced the expression of all

mRNAs evaluated in the hypothalamus, except DRD1 and CCK; and reduced the expression of 5HT1B, 5HT2C, DRD1, CLOCK, BMAL1, PER1 and PER2 and CCK in the female hippocampus and CCK in the male hippocampus. Thus, we conclude that early weaning alters the eating behavior and expression of components of the serotonergic and dopaminergic systems in the long term. Additionally, the supplementation of miR-320-3p and miR-375-3 showed promising results as a strategy to prevent the changes promoted by early weaning, despite also presenting results similar to early weaning.

Keywords: Feeding behavior. Early weaning. Dopamine. MicroRNA. Serotonin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema metodológico do desmame precoce adotado neste estudo.	47
Figura 2 –	Ilustração demonstrando o modelo de inserção do gene gfp na região promotora do gene cck para criação do rato transgênico.	52
Figura 3 –	Efeitos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar de ratos adultos de ambos os sexos	60
Figura 4 –	Efeitos do desmame precoce sobre a massa corporal de ratos adultos de ambos os sexos.	61
Figura 5 –	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão de genes relacionados ao comportamento alimentar no hipotálamo e tronco encefálico de ratos machos adultos.	62
Figura 6 –	Efeitos do desmame precoce sobre a massa do fígado e da gordura abdominal de ratos adultos de ambos os sexos	63
Figura 7 –	Efeitos do desmame precoce sobre parâmetros metabólicos de ratos adultos de ambos os sexos	64
Figura 8 –	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de micrnas no hipotálamo	65
Figura 9 –	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de mrnas no hipotálamo	66
Figura 10 –	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de micrnas no tronco encefálico	68
Figura 11 –	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de mrnas no tronco encefálico	69
Figura 12 –	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de micrnas no hipocampo	70
Figura 13 –	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de mrnas no hipocampo	71
Figura 14 –	Efeitos do desmame precoce + suplementação de mir-320-3p sobre a expressão de micrnas no hipotálamo	73
Figura 15 –	Efeitos do desmame precoce + suplementação de mir-320-3p sobre a expressão de mrnas no hipotálamo	74

Figura 16 –	Efeitos do desmame precoce + suplementação de mir-320-3p sobre a expressão de micrnas no tronco encefálico	76
Figura 17 –	Efeitos do desmame precoce + suplementação de mir-320-3p sobre a expressão de mrnas no tronco encefálico	77
Figura 18 –	Efeitos do desmame precoce + suplementação de mir-320-3p sobre a expressão de micrnas no hipocampo	79
Figura 19 –	Efeitos do desmame precoce + suplementação de mir-320-3p sobre a expressão de mrnas no hipocampo	80
Figura 20 –	Efeitos da suplementação oral de mir-375-3p sobre a expressão de micrnas no hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico de ratos	82
Figura 21 –	Efeitos da suplementação de mir-375-3p sobre a expressão de mrnas no hipotálamo	83
Figura 22 –	Efeitos da suplementação de mir-375-3p sobre a expressão de mrnas no hipocampo	84
Figura 23 –	Efeitos da suplementação de mir-375-3p sobre a expressão de mrnas no tronco encefálico	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição nutricional da dieta utilizada no estudo I (presence®)	45
Tabela 2 –	Sequências dos primers utilizados para as análises de expressão gênica de 5ht1b, 5ht2c, sert, drd1, drd2, npy, pomc e gene de referência β 2m	50
Tabela 3 –	Composição nutricional da dieta utilizada durante a gestação e lactação no estudo II - safe® a03	52
Tabela 4 –	Composição nutricional da dieta de manutenção utilizada no estudo II - safe® a04	53
Tabela 5 –	Primers utilizados para análises de expressão de mrna com sistema sybr®, incluindo os 3 genes de referência β 2m, gapdh e β -actina	57
Tabela 6 –	Primers utilizados para análises de expressão de mrna e mirna com sistema taqman®, incluindo os genes de referência para os mirnas, mir-let-7g, mir-let-7d e mir-146-5p	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região não traduzida 3'
5HT	Serotonina
5HT1A	Receptor serotoninérgico 1A
5HT1B	Receptor serotoninérgico 1B
5HT2C	Receptor serotoninérgico 2C
5HT4	Receptor serotoninérgico 4
5HT7	Receptor serotoninérgico 7
AgRP	Proteína relacionada ao gene agouti
AME	Aleitamento materno exclusivo
AMT	Aleitamento materno total
ARQ	Núcleo arqueado do hipotálamo
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Bcl-2	Linfoma de células B 2
BMAL1	proteína 1 do tipo translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto aril ou ARNT-Like 1 do cérebro e músculo
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CART	Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina
CCK	Colecistoquinina
cDNA	DNA complementar
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CMS	Estresse crônico de vida leve
CUMS	Estresse crônico imprevisível de vida leve
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DCNT	Doença crônica não transmissível
DICER	RNAse de processamento de microRNAs
DLX	Duloxetina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DOSP	Dioleil-succinil-paromomicina
DOSRI	Dioleil-succinil-ribostamicina

DOSSRI	Dioleil-succinil-serinil-ribostamicina
DOSST	Dioleil-succinil-serinil-tobramicina
DRD1	Receptor dopaminérgico D1
DRD2	Receptor dopaminérgico D2
DRD3	Receptor dopaminérgico D3
FLX	Fluoxetina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC	Glicocorticoides
GFP	Proteína verde fluorescente
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon
GPe	Globo pálido externo
hnRNPk	Ribonucleoproteína K nuclear heterogênea
IBS	Síndrome do intestino irritável
IBS-D	Síndrome do intestino irritável com perfil de diarreia
iPSC	Célula-tronco pluripotente induzida
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
MDD	Transtorno de depressão maior
MiR	MicroRNA
MiRNA	MicroRNA
mPFC	Córtex pré-frontal medial
mRNA	RNA mensageiro
NAc	Núcleo accumbens
NPY	Neuropeptídeo Y
OB	Bulbo olfatório
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PER1	Period1
PER2	Period2
PFC	Córtex pré-frontal
Polr3d	Subunidade RPC4 da RNA polimerase III
POMC	Pró-opiomelanocortina
PYY	Peptídeo YY
QI	Quociente de inteligência
RNA	Ácido ribonucleico

RNAi	Interferência de RNA
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SERT	Transportador de serotonina
SN	Substancia negra
SNC	Sistema nervoso central
SNc	Substancia negra pars compacta
SNr	Substancia negra pars reticulada
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TGI	Trato gastrointestinal
TH	Tirosina hidroxilase
TKO	<i>Knockout</i> triplo
UNICEF	Fundo das nações unidas para a infância
VEC	Vesículas extracelulares
VTA	Área tegumentar ventral
β2M	β-2-microglobulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	ALEITAMENTO MATERNO – UMA QUESTÃO DE SAÚDE PÚBLICA	20
2.2	A RELAÇÃO DO ALEITAMENTO MATERNO COM O DESENVOLVIMENTO E SAÚDE EM HUMANOS	23
2.3	A RELAÇÃO DO DESMAME PRECOCE COM O DESENVOLVIMENTO NEUROQUÍMICO E COMPORTAMENTAL AO LONGO DA VIDA – EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS COM ROEDORES	26
2.4	COMPORTAMENTO ALIMENTAR, SEROTONINA E DOPAMINA	30
2.5	MICRORNAS NO CONTEXTO DA REGULAÇÃO DOS SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO	34
2.6	SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE MICRORNAS COMO POSSÍVEL ESTRATÉGIA DE INTERVENÇÃO EPIGENÉTICA NO CONTEXTO DO ESTRESSE PERINATAL	40
3	HIPÓTESES	43
4	OBJETIVOS	44
4.1	GERAL	44
4.2	ESPECÍFICOS	44
5	MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1	EXPERIMENTO I – ESTUDO DOS EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR, SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO DE RATOS ADULTOS	45
5.1.1	Animais	45
5.1.2	Desmame precoce	46
5.1.3	Grupos experimentais	47
5.1.4	Ingestão alimentar de alimento padrão em resposta à privação alimentar	47
5.1.5	Ingestão alimentar de 24h e por fases do ciclo circadiano	48
5.1.6	Ingestão alimentar de alimento palatável	48
5.1.7	Avaliação da massa corporal	48
5.1.8	Avaliação de parâmetros metabólicos	48
5.1.9	PCR em tempo real	49

5.1.10	Análises estatísticas	50
5.2	EXPERIMENTO II – EFEITOS MOLECULARES DO DESMAME PRECOCE E SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MIR-320-3P E MIR-375-3P SOBRE O CÉREBRO DE RATOS	50
5.2.1	Animais	50
5.2.2	Suplementação oral de miR-320-3p, miR-375-3p e desmame precoce	53
5.2.3	Grupos experimentais	54
5.2.4	Obtenção e preparação dos tecidos	55
5.2.5	PCR em tempo real	56
5.2.6	Análises estatísticas	58
6	RESULTADOS	59
6.1	EXPERIMENTO I - ESTUDO DOS EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR, SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO DE RATOS ADULTOS	59
6.1.1	Efeitos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar de ratos machos e fêmeas adultos	59
6.1.2	Efeitos do desmame precoce sobre a massa corporal de ratos machos e fêmeas adultos	61
6.1.3	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão de genes relacionados à ingestão de alimentos no hipotálamo e tronco encefálico de ratos machos adultos	62
6.1.4	Efeitos do desmame precoce sobre parâmetros metabólicos em ratos adultos machos e fêmeas	62
6.2	EXPERIMENTO II – EFEITOS MOLECULARES DO DESMAME PRECOCE E SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MIR-320-3P E MIR-375-3P SOBRE O CÉREBRO DE RATOS	64
6.2.1	Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de microRNAs e mRNAs associados com o controle central do comportamento alimentar	64
6.2.2	Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de microRNAs e mRNAs associados com o controle central do comportamento alimentar	72

6.2.3	Efeitos da suplementação de miR-375-3p sobre a expressão de microRNAs e mRNAs associados com o controle central do comportamento alimentar	81
7	DISCUSSÃO	86
7.1	EXPERIMENTO I	86
7.2	EXPERIMENTO II	92
8	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL “EARLY WEANING LEADS TO DISRUPTION OF HOMEOSTATIC AND HEDONIC EATING BEHAVIORS AND MODULATES SEROTONIN (5HT) AND DOPAMINE (DA) SYSTEMS IN MALE ADULT RATS.”	113
	APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO “EARLY LIFE STRESS AND THE ONSET OF OBESITY: PROOF OF MICRORNAS’ INVOLVEMENT THROUGH MODULATION OF SEROTONIN AND DOPAMINE SYSTEMS’ HOMEOSTASIS”.	119
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	127

1 INTRODUÇÃO

Diversos problemas para o desenvolvimento humano são descritos na literatura em decorrência da interrupção precoce do aleitamento materno (QIAO et al., 2020; TSENG et al., 2019; YAN et al., 2014). Por isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o aleitamento materno exclusivo (AME) seja praticado durante os seis primeiros meses de vida, e, a partir desse momento, continuar com a introdução alimentar e até os dois anos de vida (WHO, 2008).

Apesar das recomendações da OMS, a prevalência de AME encontra-se aquém do esperado, o que pode estar associado à elevada prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como obesidade e diabetes, por exemplo (BOCCOLINI et al., 2017a; UNICEF, 2019). São robustas as evidências em humanos associando a falta do aleitamento materno com o surgimento de DCNTs, principalmente obesidade infantil, além de diminuição na performance cognitiva e neurodesenvolvimento (CAI et al., 2016; QIAO et al., 2020; TSENG et al., 2019).

Apesar disto, pouco se conhece a respeito dos mecanismos pelos quais o desmame precoce leva a essas alterações, o que faz a comunidade científica lançar mão de modelos animais para realizar estas investigações. Vários estudos em roedores demonstram os efeitos deletérios do desmame precoce sobre o desenvolvimento neurocomportamental dos indivíduos. Sabemos que em roedores o desmame precoce resulta em aumento de comportamentos semelhantes à depressão, ansiedade, agressividade, menor interação social, além de promover alterações no comportamento alimentar (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; KIKUSUI et al., 2006; KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007a; KIKUSUI; MORI, 2009; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004; NAKAMURA et al., 2008a; OLIVEIRA et al., 2011; TAVARES et al., 2020a, 2020b). Sobre este último, sabe-se que o desmame precoce promove retardo da saciedade, hipofunção do sistema serotoninérgico no controle da saciedade, além de aumento de preferência e consumo de alimentos palatáveis e disfunção do sistema dopaminérgico, o que sugere também disfunção do sistema de recompensa alimentar (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; TAVARES et al., 2019, 2020a, 2020b).

Estes dois sistemas de neurotransmissão, serotoninérgico e dopaminérgico, exercem importante função regulando a ingestão alimentar, predominantemente através dos componentes homeostático e hedônico do comportamento alimentar, respectivamente. A serotonina é conhecida pela promoção da saciedade através de

sinalização dos receptores 5HT1B e 5HT2C no núcleo arqueado do hipotálamo (HEISLER et al., 2006). Por outro lado, a dopamina é conhecida por agir sobre o circuito mesocorticolímbico através de seus grupos de receptores DRD1 e DRD2 para regular a recompensa alimentar (VOLKOW; WANG; BALER, 2011; WISE, 1989). A disfunção destes sistemas pode estar associada com perturbações no controle central da ingestão alimentar, o que pode ser associado ao desenvolvimento da obesidade. Desta forma faz-se necessária a compreensão de como o desmame precoce afeta o comportamento alimentar e os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico.

Uma das possíveis razões pela qual estes sistemas poderiam estar sendo modulados pelo estresse pode ser modificação em nível epigenético, através da atividade de microRNAs (miRNAs). MicroRNAs, são RNAs não codificantes com cerca de ~22 nucleotídeos que atuam de forma geral na repressão da tradução de genes, apesar de em alguns casos eles atuarem estimulando a tradução ou até mesmo como autos reguladores ou reguladores de outros microRNAs (BARTEL, 2004; O'CARROLL; SCHAEFER, 2013). Os microRNAs que parecem estar mais associados neste contexto são os miR-16-5p e miR-504, os quais atuam na regulação dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, respectivamente, e são suscetíveis à exposição ao estresse no início da vida (BAI et al., 2012; SHAO et al., 2018; TAVARES; TORRES; DE SOUZA, 2020; ZHANG et al., 2013b). Desta forma, o desmame precoce poderia promover alterações nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico através da modulação dos miR-16-5p e miR-504.

Os microRNAs estão incluídos inclusive no contexto da composição do leite materno. Além dos nutrientes convencionais, encontramos no leite materno vesículas extracelulares contendo microRNAs, como por exemplo os miR-320-3p e miR-375-3p, ricamente abundantes em vesículas extracelulares no leite materno, os quais modulam em nível epigenético o desenvolvimento metabólico (HERWIJNEN et al., 2018). A falta do leite materno também pode alterar o desenvolvimento adequado através da falta destes moduladores epigenéticos nele contidos. Vários estudos recentes têm estudado a utilização de forma terapêutica dos microRNAs ou até mesmo como marcadores diagnósticos de doenças (BEUZELIN; PITARD; KAEFFER, 2019; LIU; SALL; YANG, 2008; RAVANIDIS et al., 2020). A utilização de vesículas extracelulares biomiméticas têm se mostrado promissora neste contexto, para ser utilizada como veículo para suplementação de microRNAs (BEUZELIN; KAEFFER, 2018; BEUZELIN; PITARD; KAEFFER, 2019).

Estudos recentes demonstram que a suplementação oral do miR-320-3p através de nano vesículas biomiméticas é efetiva e possui impacto metabólico, inclusive de acordo com o ritmo circadiano. Além disso, este microRNA é apontado como importante ator no contexto do desenvolvimento de DCNTs, particularmente diabetes mellitus (BEUZELIN; KAEFFER, 2018; BEUZELIN; PITARD; KAEFFER, 2019). Assim a suplementação oral de microRNAs com potencial impacto metabólico surge como uma estratégia nutricional potencial na prevenção de desordens metabólicas.

Visto que os problemas associados ao desmame precoce possuem um impacto negativo significativo para a sociedade, desde aspectos de saúde, como também de aspectos econômicos, mais estudos buscando elucidar os mecanismos e formas de prevenção são necessários. O estudo dos impactos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar são necessários para entender como este evento pode modular o desenvolvimento neurocomportamental, nos fornecendo mais embasamento para lutas no campo das políticas públicas, investimento e promoção do aleitamento materno. Além disso, entender estes mecanismos pode nos fornecer conhecimentos para o desenvolvimento de terapias e de formas de manejar o problema.

Desta forma, este estudo objetiva estudar os impactos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar homeostático e hedônico em longo prazo, bem como a expressão de genes relacionado com os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico. Além disso, buscamos avaliar os impactos do desmame precoce na regulação epigenética através de microRNAs sobre componentes relacionados com o comportamento alimentar, e o possível papel preventivo da suplementação oral pós-natal de miR-320-3p e miR-375-3p.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALEITAMENTO MATERNO – UMA QUESTÃO DE SAÚDE PÚBLICA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a prática do AME desde o nascimento até sexto mês de vida da criança, a partir de quando recomenda o início do processo de introdução alimentar (WHO, 2008). Além disso, a OMS recomenda que, a partir do sexto mês de vida, o aleitamento seja continuado em paralelo à introdução de alimentos até os dois anos de idade (WHO, 2008).

O aleitamento materno é atualmente reconhecido como um dos principais fatores determinantes da saúde dos indivíduos ao longo da vida. Vários estudos demonstram que o aleitamento materno possui efeito protetivo sobre o desenvolvimento. Por exemplo, crianças submetidas a maior tempo de amamentação apresentaram melhor trajetória de crescimento e menos risco de obesidade aos quatro anos de idade (ANDERSON et al., 2020). Este mesmo estudo apresentou que a simples presença do aleitamento materno tem efeitos de diminuição do risco de obesidade, e que independente do tempo de aleitamento, seja de sete ou treze meses, há proteção contra a obesidade do mesmo jeito (ANDERSON et al., 2020). Além disso, a amamentação contribui para um melhor desenvolvimento cognitivo e reduz os riscos de desenvolvimento de diabetes tipo 1 e tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, dislipidemias e alguns tipos de cânceres (BINNS; LEE; LOW, 2016). Evidências também associam a prática do aleitamento materno com uma boa saúde bucal, diminuindo o risco de cáries, quando praticado até os 12 meses e também de mal oclusão da primeira dentição (PERES et al., 2018).

Este tópico se faz tão importante que alguns estudos buscaram sumarizar revisões a respeito da associação do aleitamento materno com o estado de saúde. Um editorial da *ACTA PAEDIATRICA* sumarizou as principais influências da amamentação sobre o desenvolvimento, apontando a importância do aleitamento materno na proteção contra doenças infecciosas e desnutrição, causados por água contaminada ou hiperdiluição de fórmulas alimentares, mortalidade infantil, otite média, déficits cognitivos, obesidade, má oclusão e asma (GRUMMER-STRAWN; ROLLINS, 2015).

Porém, mesmo sabendo de todos os benefícios do aleitamento materno, ainda há muito a ser feito para que esta prática seja amplamente realizada. Dados do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) apontam que, em nível global, 43% das crianças nascidas recebem aleitamento materno na primeira hora de vida, 41% são

amamentadas exclusivamente até os 6 meses de vida, 70% ainda são amamentadas no primeiro ano de vida e 45% ainda são amamentadas no segundo ano de vida, sendo a meta para estes parâmetros até o ano de 2030 70%, 70%, 80% e 60%, respectivamente (UNICEF, 2019). Além disso, dados de estudo realizado com crianças nascidas entre 2008 e 2009 na comunidade de Madrid, na Espanha, mostram prevalência de aleitamento materno exclusivo e aleitamento materno de 77,6% e 88%, respectivamente (RAMIRO GONZÁLEZ et al., 2018). Porém, apesar da alta prevalência de aleitamento, apenas 25,4% amamentaram exclusivamente durante os 6 primeiros meses de vida (RAMIRO GONZÁLEZ et al., 2018). Em outro estudo realizado na Espanha, desta vez na comunidade de Asturias, com 151 mulheres puérperas, foi demonstrado que a taxa de aleitamento materno ao longo da alta hospitalar é bem mais baixa do que o esperado, e além disso esse valor diminui 15 dias após a alta, concomitantemente com o aumento da introdução de alimento artificial (MAZO-TOMÉ; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, 2018).

Além da Espanha, estudos em outros países buscaram investigar a prevalência do aleitamento materno. No Canadá, uma coorte com 565 mulheres imigrantes e chinesas nascidas no Canadá apontou que o método de alimentação mais utilizado nas crianças foi o de aleitamento materno não exclusivo (32,9%) e que o aleitamento materno exclusivo até os seis meses teve prevalência de 26,8% (DENNIS et al., 2019). No distrito de Trongsa, no Butão, em estudo realizado com 192 mães, foi observado que a prevalência de aleitamento materno exclusivo durante o primeiro ano de vida foi de 97%, porém esse número cai para 58% aos seis meses (TSHERING et al., 2018). Por outro lado, em Bahir Dar, Etiopia, em amostra de 499 mulheres, foi observada uma alta prevalência de aleitamento materno exclusivo (89,6%) (BELACHEW et al., 2018).

No Brasil, a partir de dados de instituições oficiais, no ano de 2018, reunidos pela Fundação ABRINQ, foi observado que 52% das crianças menores de seis meses receberam aleitamento exclusivo durante algum período, com esse número variando para cada região: Norte (66%), Nordeste (55%), Sudeste (50%), Sul (47%) e Centro-oeste (56%) (FUNDAÇÃO ABRINQ, 2020). Apesar destes resultados relativamente positivos, um estudo apontou que a prática de aleitamento exclusivo durante os 6 meses de vida, no Brasil, cresceu de 2,9% em 1986 para 37,1% em 2006. Porém, este número estagnou, se mantendo em 36,6% no ano de 2013, sugerindo um platô (BOCCOLINI et al., 2017b). Além de estudos em escala nacional, alguns trabalhos

apresentam dados locais, como nas cidades de Pelotas, no Sul, e na cidade de Coelhos, no Nordeste. Na coorte de pelotas foi observado que a prevalência de aleitamento materno aos 12 meses aumentou de 16% a 41% entre 1982 e 2015, e que a prevalência de aleitamento exclusivo nos 3 primeiros meses de vida aumentou de 7% em 1993 para 45% em 2015 (SANTOS et al., 2019). No caso da cidade de Coelhos, em 2015, a prevalência de aleitamento materno na primeira hora de vida, exclusivo até os 6 meses, continuado até um ano e continuado até 2 anos foram de 60.2%, 32.9%, 45.9, e 35.9%, respectivamente (SILVA et al., 2019).

Estes resultados apontam que a prevalência de aleitamento materno varia bastante de acordo com a localização geográfica, mesmo dentro de um mesmo país. Adicionalmente, observamos que apesar de melhorias observadas nos últimos anos, a prevalência de aleitamento materno está aquém do esperado, principalmente no que diz respeito ao aleitamento materno exclusivo durante os seis primeiros meses de vida.

A partir disto, nos questionamos sobre qual é o motivo de ainda observarmos números baixos, mesmo sabendo de todos os benefícios do aleitamento materno. Segundo a UNICEF/OMS, alguns fatores são determinantes para o sucesso e implementação do aleitamento materno, dentre eles investimentos em programas e políticas que promovem, protegem e suportam a amamentação; Regulação do marketing acerca substitutos do leite materno; proteção materna no ambiente de trabalho; Iniciativas de hospitais amigos da criança; Aconselhamento e treinamento sobre amamentação; Programas de suporte comunitário; E monitoramento dos sistemas (UNICEF, 2019). Dados recentes da UNICEF/OMS apontam que, em nível global, apenas 6% dos países investiram pelo menos \$5,00 por criança para o suporte da amamentação; 18% dos países implementaram por completo o código de propaganda de substitutos de leite materno; 11% dos países oferecem a licença maternidade recomendada; 14% dos países têm metade dos partos ocorrendo em instituições amigas da criança; 56% dos países oferecem aconselhamento acerca da alimentação da criança e do adolescente nos serviços primários; 47% dos países possuem a maioria dos distritos com programas comunitários de aconselhamento em alimentação infantil; 41% dos países realizaram programas de amamentação nos últimos cinco anos; E 36% dos países coletaram dados acerca do aleitamento materno nos últimos 5 anos (UNICEF, 2019).

Além destes fatores, a obesidade materna é apontada como um fator prejudicial para o início do aleitamento materno e início da lactogênese, sendo a prevenção da obesidade materna e aconselhamento de mulheres obesas essenciais para o sucesso do aleitamento materno (GARCIA et al., 2016). O tipo de parto, status socioeconômico, conhecimento prévio sobre aleitamento materno, grupos de apoio e tecnologia também são apontados como determinantes para o sucesso ou não do aleitamento materno (SAYRES; VISENTIN, 2018). Desta forma, a partir do conhecimento dos benefícios do aleitamento materno e de todos os fatores que influenciam no sucesso desta prática, melhorias nos investimentos de programas e políticas neste contexto são fundamentais.

2.2 A RELAÇÃO DO ALEITAMENTO MATERNO COM O DESENVOLVIMENTO E SAÚDE EM HUMANOS

Nas últimas décadas, vários grupos de estudos ao redor do mundo buscaram investigar a associação da presença e do tempo de aleitamento materno sobre o desenvolvimento dos indivíduos. A maioria destes estudos se tratam de avaliações epidemiológicas prospectivas, estudos longitudinais e alguns estudos de caso-controle. Apesar de algumas controvérsias e inconsistências na literatura, quando avaliados como um todo, os estudos apontam um forte papel do aleitamento materno como um fator protetivo contra a obesidade infantil, distúrbios alimentares, problemas cognitivos, emocionais, de personalidade e motores.

No que diz respeito ao comportamento alimentar, crianças que são submetidas à introdução de alimentação complementar antes dos 6 meses de vida tem mais chances desenvolver neofobia alimentar a apresentam aceitação alimentar limitada (SHIM et al., 2011). Em contrapartida, a introdução alimentar após os 6 meses e a duração da amamentação por mais de 6 meses diminuíram os riscos de desenvolver seletividade alimentar (SHIM et al., 2011). Além disso, Crianças amamentadas exclusivamente durante os 6 primeiros meses de vida tiveram menores chances de desenvolver preferência por métodos específicos de preparação de alimentos, rejeição alimentar, e neofobia alimentar (SHIM et al., 2011). Outros estudos também observaram papel protetivo do aleitamento materno sobre a seletividade alimentar quando feito de forma exclusiva durante 4-5 meses em comparação a períodos menores que um mês (SPECHT et al., 2018) e em crianças amamentadas por períodos iguais ou maiores do que 6 meses, quando comparadas à crianças amamentadas por menos de 2 meses (DE BARSE et al., 2017). Adicionalmente, foi

observada associação positiva do AME durante 6-10 meses com maior consumo diário de vegetais (SPECHT et al., 2018).

De uma forma geral, é observado que o aleitamento materno está associado com redução de riscos alimentares em crianças (BELL et al., 2018) e melhores padrões alimentares quando comparadas à crianças que consumiram fórmulas alimentares (VENTURA, 2017), o que se deve ao fato de melhor aprendizado e preferencias formadas através das informações sensoriais transmitidas através do leite materno (VENTURA, 2017). Este processo de aprendizado dos sabores se inicia desde a exposição fetal ao líquido amniótico, e se reforça e consolida através da exposição sensorial através do leite materno (VENTURA, 2017).

Neste contexto de problemas alimentares, está a obesidade infantil, um dos problemas mais fortemente associados com a ausência do aleitamento materno. Dois artigos de meta-análises publicados em 2014 e, recentemente, em 2020, concluíram que o aleitamento materno reduz o risco de obesidade infantil e estabeleceram um efeito dose-resposta em relação ao tempo de aleitamento materno e a obesidade infantil (QIAO et al., 2020; YAN et al., 2014). Outros dois estudos também publicados em 2020 apontam os efeitos protetivos do aleitamento materno contra a obesidade (HERRING et al., 2020; PALASKA et al., 2020). O primeiro mostra que a prevalência de eutrofia é maior em crianças amamentadas por mais de 6 meses, quando comparadas àquelas amamentadas por menos de 6 meses, além de ser observada menor proporção de baixo peso, sobrepeso e obesidade em crianças amamentadas por mais de 6 meses (PALASKA et al., 2020). O segundo estudo buscou relacionar o tempo de aleitamento materno, tempo de sono e obesidade em crianças (HERRING et al., 2020). Os resultados apontam uma correlação negativa entre tempo de aleitamento materno e obesidade, além de maior média de horas de sono em crianças que foram amamentadas, demonstrando efeitos do aleitamento materno sobre a qualidade do sono (HERRING et al., 2020).

Associações entre o tempo e presença de aleitamento materno também são encontradas no que diz respeito à aspectos emocionais, cognitivos, motores e de personalidade. Em estudo realizado no Japão, observa-se efeitos positivos do aleitamento materno sobre os comportamentos emocionais em pré-adolescentes (KOSHIYAMA et al., 2020). Interessantemente, neste estudo foram observados efeitos do aleitamento materno sobre a morfologia do cérebro, onde observou-se correlação positiva do tempo do aleitamento materno com substância cinzenta no

estriado ventral e dorsal e no giro orbital medial (KOSHIYAMA et al., 2020). Ainda se nota que o volume do giro orbital medial mediou a associação entre o tempo de aleitamento e o comportamento emocional (KOSHIYAMA et al., 2020). Reforçando o efeito do aleitamento materno sobre a morfologia cerebral, um estudo realizado com crianças nascidas à pré-termo mostra que o leite materno promove aumento da massa cinzenta nuclear profunda na idade equivalente a termo e melhor performance de QI aos 7 anos de idade, matemática, memória de trabalho, e função motora (BELFORT et al., 2016). Vários outros estudos também apontam os efeitos do aleitamento materno sobre o desenvolvimento mental em geral e aspectos cognitivos como inteligência, memória e linguagem (BELFORT et al., 2016; CAI et al., 2016; EICKMANN et al., 2007; GUZZARDI et al., 2020; LEVENTAKOU et al., 2015; ORENGUL et al., 2019; RUIZ et al., 2013)

Mesmo em longo prazo, podemos observar efeitos do aleitamento materno sobre a cognição. Um dos estudos prospectivos de maior tempo já realizado aponta que o aleitamento materno é positivamente associado com realização educacional dos indivíduos com 26 anos, e habilidade de leitura aos 53 anos, ambos relacionados com parâmetros cognitivos aos 15 anos de idade (RICHARDS; HARDY; WADSWORTH, 2002).

Ansiedade e depressão são outros problemas estudados em relação ao aleitamento materno. Em estudo com crianças diagnosticadas com ansiedade em comparação a um grupo controle, o tempo de AME e aleitamento materno total (AMT) é significativamente menor no grupo diagnosticado com ansiedade, assim como o uso alimentação através de mamadeira foi maior neste grupo (ORENGUL et al., 2019). No Brasil, um estudo mostra que adolescentes que foram amamentados por mais de 6 meses apresentam menor risco de desenvolvimento de transtornos mentais comuns, quando comparados aos que não receberam aleitamento materno ou o receberam por menos de um mês (DE ALMEIDA et al., 2019). Já na China, observa-se que a amamentação por períodos maiores do que 6 meses diminui as chances de comportamentos de internalização e depressão em escolares, em comparação a nunca amamentados (HUANG et al., 2019). Quando submetidas ao teste de modelo de cinco fatores de personalidade, adultos com idade média de 28,98 anos que receberam aleitamento materno apresentaram menor pontuação para ansiedade, neuroticismo e hostilidade (SUTIN; STEPHAN; TERRACCIANO, 2016).

Além destes problemas, o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é descrito como associado à presença do aleitamento materno. Uma meta-análise publicada em 2019 mostra que crianças com TDAH são submetidas a menor tempo de aleitamento materno (TSENG et al., 2019). Crianças com TDAH tem menor taxa de AME de 6 a 12 meses, em contrapartida apresentam maiores taxas de AME em menos de 3 meses de vida (TSENG et al., 2019). A conclusão do estudo é que a ausência do aleitamento materno está relacionada ao TDAH (TSENG et al., 2019). Outro estudo publicado mais recentemente confirma que a duração do aleitamento materno é menor em crianças diagnosticadas com TDAH (SEPEHRMANESH et al., 2020). Somando-se à estas evidências, na Austrália um estudo aponta ainda que o aleitamento materno tem influência positiva sobre o desenvolvimento motor (GRACE et al., 2017). Crianças e adolescentes nas idades 10, 14 e 17 apresentaram melhor desenvolvimento motor quando submetidas à aleitamento materno por tempo igual ou maior do que 6 meses (GRACE et al., 2017).

Apesar de alguns estudos que apresentam resultados controversos, há um consenso entre a comunidade científica sobre os benefícios do aleitamento materno sobre a saúde e robustas evidências suportando isto. Além disso, estudos experimentais com animais demonstram efeitos comportamentais semelhantes a estes observados em humanos, e vão ainda além, demonstrando possíveis mecanismos neurofisiológicos associados.

2.3 A RELAÇÃO DO DESMAME PRECOCE COM O DESENVOLVIMENTO NEUROQUÍMICO E COMPORTAMENTAL AO LONGO DA VIDA – EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS COM ROEDORES

Devido à importância do aleitamento materno, os efeitos da ausência deste estímulo sobre o desenvolvimento têm sido estudados em várias espécies. Além do fator nutricional, o aleitamento materno envolve outro importante fator para a modulação do desenvolvimento: o contato materno. O desmame precoce promove a ausência de ambos, aporte nutricional e contato materno, e por esta razão um dos modelos mais utilizados de desmame precoce em roedores consiste em separação de mães e filhotes em idade precoce, anterior à idade natural de desmame nos animais. Em estudos realizados utilizando este tipo de modelo, já é bastante consolidado o desenvolvimento de comportamentos semelhantes à ansiedade em ratos e camundongos de ambos os sexos, porém com efeito mais persistente em machos (ITO et al., 2006; IWATA et al., 2007; KANARI et al., 2005; KIKUSUI et al.,

2019; KIKUSUI; ISAKA; MORI, 2005; KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007b; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004; KODAMA et al., 2008; ONO et al., 2008; SHIMOZURU et al., 2007).

Além da observação das mudanças comportamentais, várias alterações neuroquímicas são observadas em associação com os comportamentos de ansiedade. Por exemplo, menor massa encefálica é observada em camundongos machos e fêmeas desmamados precocemente com oito e cinco semanas de vida, respectivamente (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007b). No que diz respeito à mielinização encefálica, apenas em machos é observada alteração no geral, apresentando aumento robusto até a terceira semana de vida, com diminuição por volta da quinta semana. Na amígdala, é observada mielinização precoce também em machos, porém o córtex pré-frontal medial (mPFC) e o hipocampo não apresentam alterações de mielinização (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007b; KODAMA et al., 2008; ONO et al., 2008). A sinalização de glicocorticoides (GC) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) também foi descrita como alterada no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos machos desmamados precocemente, sendo um dos possíveis mecanismos da ansiedade (KIKUSUI et al., 2019). Além disso, a expressão de BDNF no hipocampo é alterada em machos, e a neurogênese nesta região é alterada em ambos os sexos (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009).

O sistema de glicocorticoides também está bem associado com a gênese da ansiedade nestes animais. O desmame precoce em camundongos de ambos os sexos promove aumento nos níveis de corticosterona circulante durante 48h seguintes ao desmame, quando em animais controle os níveis permanecem altos apenas 2h após o desmame (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). Em camundongos machos desmamados precocemente são observados níveis elevados de corticosterona basal com oito semanas de idade. Por outro lado, em animais de ambos os sexos submetidos ao desmame precoce, a exposição ao teste do labirinto elevado promove aumento dos níveis de corticosterona (KIKUSUI et al., 2006). Comprovando a ação dos glicocorticoides na gênese da ansiedade em animais desmamados precocemente, a adrenalectomia nestes animais reverte o comportamento de ansiedade, assim como a infusão de antagonista de glicocorticoide no mPFC reduz os níveis de ansiedade (KIKUSUI et al., 2019). Interessantemente, o bloqueio da síntese excessiva de corticosterona nas primeiras 48h após o desmame também é capaz de reduzir os níveis de ansiedade apresentados pelos animais desmamados

precocemente (KIKUSUI et al., 2019). As alterações neuroendócrinas são tantas que em ratos machos submetidos ao desmame precoce, quando expostos a um novo ambiente, respostas autônomas mais exacerbadas são observadas, como hipertermia, taquicardia, redução do descanso e aumento de comportamento de cheirar o ambiente (ITO et al., 2006). Desta forma fica claro o papel da desregulação neuroendócrina e como isso afeta o comportamento de ansiedade.

Além de comportamentos de ansiedade, a agressividade de animais desmamados precocemente também é bem descrita na literatura. A exposição ao estresse em resposta à privação alimentar promove aumento de agressividade em camundongos machos submetidos ao desmame precoce, mas não a exposição à um intruso. Estes resultados são acompanhados pela redução da expressão gênica de receptores 5HT1B no hipocampo (NAKAMURA et al., 2003). Em outro teste de agressividade, camundongos machos foram submetidos a isolamento social durante um mês, quando foram reagrupados com outros camundongos machos estranhos durante uma semana (KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004). Ao final do experimento, foram observadas mais feridas na cauda e região posterior do tronco nos camundongos desmamados precocemente, sugerindo maior agressividade nestes animais (KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004).

Junto à agressividade, o comportamento chamado de *play-fighting behavior*, ou comportamento de brincar, que se relaciona com os padrões de interação social de roedores, é diminuído em ratos machos e fêmeas desmamados precocemente (SHIMOZURU et al., 2007). Outro estudo que demonstra as relações sociais em resposta ao desmame precoce apontou que, entre 70 e 80 dias de vida, camundongos desmamados precocemente apresentam clara preferência sexual por potenciais parceiros, quando essa preferência não é observada em animais regularmente desmamados (TERRANOVA et al., 2000). Interessantemente, ainda no contexto das relações sociais, o desmame precoce parece afetar o que poderíamos chamar de comportamentos de empatia com os outros animais (KIKUSUI et al., 2016). Neste teste os animais foram submetidos à dor através de constrição abdominal causada por administração de ácido acético, e animais desmamados precocemente apresentam menores indicadores de dor quando alocados em pares, demonstrando que a presença de um companheiro diminui a sensação da dor (KIKUSUI et al., 2016).

Por último e não menos importante, o desmame precoce altera o comportamento alimentar e a atividade de sistemas de neurotransmissão associados

a este comportamento em roedores. Em estudos mais antigos, já se demonstrava que o desmame precoce modifica o ritmo circadiano de alimentação e retarda o ponto de saciedade em ratos machos adultos (OLIVEIRA et al., 2011), além de aumentar a preferência por alimentos palatáveis (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011). Estudos mais recentes buscaram investigar os mecanismos neurais por trás das modificações do comportamento alimentar, e encontraram forte associação com o sistema serotoninérgico. Estes estudos apontam que em ratos machos jovens, o desmame precoce promove alterações no ganho de peso do dia 15 ao dia 30 de vida, e maior peso corporal aos 40 dias de vida (TAVARES et al., 2020b). Além disso é observado aumento e diminuição da ingestão alimentar nas fases escura e clara, respectivamente (TAVARES et al., 2020b). A ação da fenfluramina, droga conhecida por seu efeito inibitório sobre a ingestão alimentar, também se apresentou diminuída nestes animais, acompanhado de aumento na expressão gênica do neuropeptídeo Y (NPY) e do transportador de serotonina (SERT) no hipotálamo, e de 5HT2C no tronco encefálico (TAVARES et al., 2020b). Em contrapartida, em fêmeas jovens, o desmame precoce provoca aumento da ingestão alimentar durante um período de 24h, modificações no padrão circadiano de alimentação, aumento de peso corporal e aumento e diminuição da expressão gênica de 5HT2C, 5HT1B e SERT no tronco encefálico e no hipotálamo, respectivamente (TAVARES et al., 2020a).

A atividade de outros sistemas de neurotransmissão e de áreas relacionadas ao comportamento alimentar também parecem estar alteradas em animais submetidos ao desmame precoce. Por exemplo, níveis duas vezes mais elevados de dopamina extracelular são observados em ratos machos desmamados precocemente, mesmo em situação basal ou após exposição ao teste do campo aberto (TAKITA; KIKUSUI, 2020). Camundongos machos desmamados precocemente também apresentam maior condicionamento à lugar em resposta à anfetamina (ADRIANI; LAVIOLA, 2002). Além disso, estes mesmos animais apresentam insensibilidade à aplicação aguda da droga, uma vez que não apresentam alteração de atividade locomotora como acontece em animais desmamados regularmente (ADRIANI; LAVIOLA, 2002). Adicionalmente, camundongos desmamados precocemente aparentemente são mais responsivos à agonista do receptor δ -opioide, apresentando maior atividade exploratória do ambiente em resposta à droga (TERRANOVA; LAVIOLA, 2001). O hipotálamo e hipocampo, importantes regiões para o controle dos comportamentos, nas quais diversos sistemas de neurotransmissão convergem,

apresentam modificações atividade na atividade antioxidante em ratos de ambos os sexos submetidos ao desmame precoce (RODRIGUES et al., 2020).

Desta forma, fica evidente a forte influência que o desmame precoce exerce sobre o desenvolvimento neurocomportamental dos indivíduos. Estes resultados experimentais condizem com os achados em estudos clínicos e epidemiológicos, em que maior risco para déficits cognitivos, distúrbios emocionais e obesidade, por exemplo, são observados em indivíduos que não foram amamentados exclusivamente. Estes estudos experimentais reforçam a necessidade da compreensão destes mecanismos, pois nos dão ideia do que pode estar acontecendo no ser humano para que esteja mais suscetível a estes problemas em resposta à ausência do aleitamento materno.

2.4 COMPORTAMENTO ALIMENTAR, SEROTONINA E DOPAMINA

O complexo controle do comportamento alimentar é realizado por interação do sistema nervoso central (SNC) com componentes periféricos (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Podem ser identificados didaticamente dois níveis de controle, um homeostático e outro hedônico (BERTHOUD; MÜNZBERG; MORRISON, 2017). O primeiro está relacionado ao controle da aquisição energética, o segundo a recompensa gerada por consumo de alimentos densamente energéticos (STOJAKOVIC et al., 2017). O hipotálamo é uma das estruturas do SNC mais bem conhecidas no controle homeostático, enquanto o núcleo accumbens (NAC), a área tegumentar ventral (VTA) e a amígdala no controle hedônico (SIMON et al., 2017). No hipotálamo, a maioria das sinalizações de órgãos da periferia são recebidas e integradas (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Entre estas estão hormônios produzidos no trato gastrointestinal e tecido adiposo, bem como nutrientes presentes na corrente sanguínea. No trato gastrointestinal são liberados em resposta ao consumo alimentar, entre outros, o peptídeo YY (PYY), a colecistoquinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) e a insulina (D'AGOSTINO et al., 2016; YOUNG, 2012). Estas substâncias sinalizam saciedade no SNC (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Até o momento, o único hormônio periférico conhecido por sinalizar fome no SNC é a ghrelina, produzida no estômago (ZANCHI et al., 2017).

O tecido adiposo produz a leptina e as adiponectinas, que apresentam ação anorexigênica no SNC (ABDALLA, 2017). A leptina é liberada em resposta ao aumento do estoque energético no tecido adiposo, e estimula a saciedade no SNC (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Camundongos sem produção de leptina ou de seu

receptor, apresentam fenótipo de obesidade (MONTAGUE et al., 1997). Alguns nutrientes presentes na corrente sanguínea também exercem função de sinalizadores do balanço energético, como é o caso da glicose, que sinaliza saciedade no SNC (BARAHONA et al., 2017). A produção e disponibilidade dessas substâncias tem o objetivo de informar ao SNC sobre o estado energético do organismo, estimulando a liberação de sinalizadores anorexígenos no balanço positivo, e orexígenos no balanço negativo (ABDALLA, 2017).

O hipotálamo é uma das principais regiões encefálicas responsáveis pela regulação da homeostase energética (ABDALLA, 2017). Seus diferentes núcleos contribuem de forma complementar para o controle do comportamento alimentar. O grande volume de achados científicos é sobre o núcleo arqueado (ARQ) (ZHANG; HERNANDEZ-SANCHEZ; HERZOG, 2019). Neste núcleo localizam-se populações neuronais orexígenas, que produzem o NPY e a proteína relacionada ao gene agouti (AgRP) e anorexígenas, que produzem a pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado a cocaína e anfetamina (CART) (BALDINI; PHELAN, 2019; VOIGT; FINK, 2015). As sinalizações das substâncias periféricas no ARQ, quando orexígenas, estimulam as populações neuronais NPY e AgRP a produzirem e secretarem seus peptídeos e inibem os neurônios POMC e CART, porém, quando a sinalização é anorexígena, os neurônios POMC e CART são ativados para inibir a ingestão alimentar e os neurônios NPY e AgRP inibidos (ABDALLA, 2017; BALDINI; PHELAN, 2019). Recentemente, foi descrito no núcleo arqueado, uma população neuronal produzindo tirosina hidroxilase e que estimula positivamente a homeostase energética (ZHANG; POL, 2016). Após a interpretação dos sinais, o ARQ projeta axônios para outros núcleos hipotalâmicos para que haja a efetivação da fome ou da saciedade (ABDALLA, 2017; BALDINI; PHELAN, 2019).

No SNC, o controle do comportamento alimentar envolve diversas estruturas e substâncias. Os sistemas de neurotransmissão possuem diferentes papéis. Entre estes, o sistema serotoninérgico tem sido extensivamente relacionado ao controle do comportamento alimentar (CARRUBA et al., 1986; GARFIELD; HEISLER, 2009; SCHWARTZ; ZELTSER, 2013; VOIGT; FINK, 2015). A serotonina é produzida nos núcleos da rafe do tronco encefálico a partir do aminoácido triptofano (SPENCER; DENERIS, 2017). Os neurônios serotoninérgicos emitem projeções axonais para todo o encéfalo (ISHIWATA; HASEGAWA; GREENWOOD, 2017). A liberação de serotonina por estas projeções é regulada pelo SERT e por autos receptores em

neurônios pré-sinápticos (VOIGT; FINK, 2015). O SERT transporta a serotonina de volta para o citoplasma do neurônio pré-sináptico, exercendo feedback negativo e inibindo sua liberação (SPENCER; DENERIS, 2017). Os receptores para serotonina são classificados em 7 famílias e distribuídos em 14 subtipos, cada um com ações específicas (PALACIOS, 2015).

Quando liberada no ARQ, a serotonina estimula a saciedade. Neste núcleo, a serotonina se liga a receptores 5HT1B localizados nos neurônios NPY/AgRP, promovendo sua inibição, ou seja, inibe a fome. Por outro lado, quando se liga aos receptores 5HT2C nos neurônios POMC/CART, promove sua ativação e consequentemente estimula a saciedade (HEISLER et al., 2006; VOIGT; FINK, 2015).

Devido à sua ação inibitória sobre a ingestão alimentar, o sistema serotoninérgico é alvo para tratamento farmacológico de distúrbios alimentares (GARFIELD; HEISLER, 2009). Dentre os fármacos serotoninérgicos utilizados para a inibição da ingestão alimentar estão os antidepressivos inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998). Os ISRS agem impedindo a recaptação da serotonina liberada na fenda sináptica, através do bloqueio do SERT, fazendo com que os níveis de serotonina aumentem (FRIZZO, 2017). O aumento dos níveis extracelulares de serotonina promove potencialização de sua ação inibitória sobre o comportamento alimentar (BLUNDELL, 1986).

Além da regulação homeostática do comportamento alimentar, que é regida pelo estado energético do indivíduo, outras áreas do SNC regulam a ingestão alimentar com base no valor de recompensa do alimento (HUME; JACHS; MENZIES, 2016). Este valor de recompensa é medido pela palatabilidade e conteúdo energético do alimento (HUME; JACHS; MENZIES, 2016). Os alimentos considerados palatáveis são aqueles com alta densidade energética, ricos em carboidratos simples, gorduras saturadas e sal (REYNAERT et al., 2015). A presença do alimento palatável tem a capacidade de estimular o apetite em indivíduos que já se encontram em estado de saciedade/saciação. O componente hedônico do comportamento alimentar pode se sobrepor à regulação homeostática e induzir consumo maior que o adequado (BERTHOUD; MÜNZBERG; MORRISON, 2017). Esse consumo excessivo está relacionado a gênese de doenças crônico-degenerativas, como a obesidade, diabetes, hipertensão, dislipidemias e outros (HUME; JACHS; MENZIES, 2016; YI-HAO YU, 2017). O controle desse componente é regido por áreas mesocorticolímbicas, que envolvem o PFC, amígdala, VTA, NAc, e outros

(BERTHOUD, 2012). Os sistemas de neurotransmissão opioidérgico e dopaminérgico atuando nessas áreas estimulam a recompensa alimentar (BERTHOUD; MÜNZBERG; MORRISON, 2017). Em indivíduos obesos são observadas alterações nesses dois sistemas de neurotransmissão, o que está relacionado com o aumento do consumo alimentar e preferência por alimentos densamente calóricos (TUOMINEN et al., 2015).

O sistema dopaminérgico inclui receptores, transportadores e enzimas envolvidas no metabolismo da dopamina. Os neurônios que sintetizam dopamina podem ser encontrados no tronco cerebral e podem ser divididos em três grupos. O primeiro grupo está na substância negra pars compacta (SNc) e envia projeções para o estriado dorsal (Caudato e Putamen). É chamado de sistema NigroStriatal. O segundo grupo está na VTA e envia projeções para o NAc, tubérculo olfatório, septo, amígdala e hipocampo. É denominado sistema mesocorticolímbico. O terceiro grupo também está na VTA, em sua porção medial, e envia projeções para o PFC, cíngulo e perirrinal. É chamado de sistema mesocortical (GARDANEH, 2010). O principal desses sistemas relacionados à regulação do comportamento alimentar é o mesocorticolímbico. Os neurônios dopaminérgicos na VTA estão envolvidos no comportamento baseado na emoção, incluindo motivação e recompensa (PHILLIPS; VACCA; AHN, 2008). Nessas áreas, a dopamina atua por meio de seus receptores, que se dividem em duas famílias. O receptor do tipo D1 e o receptor do tipo D2 podem regular a geração de cAMP (monofosfato de adenosina cíclico) (MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018). A família de receptores do tipo D1 consiste em receptores D1 e D5, com uma densidade maior no estriado, NAc, substância negra pars reticulata (SNr) e bulbo olfatório (OB) (MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018). A família de receptores de dopamina tipo D2 consiste em receptores D2, D3 e D4. O receptor de dopamina do tipo D2 é expresso principalmente no estriado, globo pálido externo (GPe), NAc, amígdala, córtex cerebral, hipocampo e pituitária (MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018).

Na regulação do comportamento alimentar, a dopamina atua decodificando propriedades palatáveis de alimentos ricos em gorduras e açúcares simples. Por causa disso, a dopamina desempenha um papel importante na regulação do sistema de recompensa (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008). Este sistema de recompensa pode ignorar pistas fisiológicas com base no estado de energia e fazer com que a ingestão de alimentos seja baseada nas propriedades recompensadoras dos alimentos. A liberação de dopamina no NAc é responsável por codificar essas

propriedades recompensadoras. O oposto também ocorre, ou seja, a ingestão de alimentos palatáveis aumenta a dopamina extracelular no NAc (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008; BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009). Além disso, a ativação de receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos no NAc medeia o aprendizado da resposta apetitiva (BODNAR, 2018). Assim, a sinalização da dopamina modula as propriedades recompensadoras da alimentação que podem substituir os sinais homeostáticos.

2.5 MICRORNAS NO CONTEXTO DA REGULAÇÃO DOS SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO

MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes com um comprimento médio de aproximadamente 22 (18-24) nucleotídeos (BARTEL, 2004). Eles regulam a expressão gênica pós-transcricional pela ligação à 3'UTR (região não traduzida) de mRNAs, alguns miRNAs também regulam a expressão de outro ou vários outros miRNAs (TRUSCOTT; ISLAM; FROLOV, 2016), e até mesmo eles próprios (ZISOULIS et al., 2012). Geralmente, miRNAs inibem especificamente a síntese de proteínas reprimindo a tradução ou induzindo a deadenilação e degradação do mRNA alvo (BARTEL, 2004), mas também foram relatados para ativar a tradução (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011). Cada miRNA tem a capacidade de atingir centenas de transcritos diversos, e um único mensageiro pode ser modulado por vários miRNAs, isso representa um sistema altamente coordenado e regulação ajustada da expressão de proteínas (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; O'CARROLL; SCHAEFER, 2013). Apesar de ser um campo de estudo ainda escasso, alguns estudos apontam que componentes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico são regulados epigeneticamente através da ação de microRNAs.

A maioria dos estudos disponíveis sobre o sistema serotoninérgico descreve o papel dos miRNAs na atividade do transportador de serotonina (SERT), que tem importante papel na regulação da ingestão alimentar. No que diz respeito ao SERT, o miR-16 consolida-se como mediador da sua atividade. Foi demonstrado que SERT é um alvo para miR-16 e que a presença deste miR promove redução na expressão da proteína SERT in vitro (BAUDRY et al., 2010). O tratamento com o ISRS fluoxetina (FLX) foi capaz de aumentar os níveis de miR-16 nos núcleos da rafe de camundongos, demonstrando uma relação entre o miR-16 e a resposta aos antidepressivos (BAUDRY et al., 2010). Em estudos com humanos com depressão e em um modelo animal de depressão com camundongos, a relação entre miR-16 e

SERT no processo fisiopatológico da depressão também foi demonstrada (SHAO et al., 2018; SONG et al., 2015). Outro estudo também demonstrou *in vitro* em células humanas e de rafe de ratos que miR-16 e miR-15a promovem a diminuição dos níveis de proteína SERT (MOYA et al., 2013). Em relação à depressão, em um modelo com ratos foi demonstrado que a eletroacupuntura melhora os padrões de comportamento de ratos deprimidos e promove uma diminuição da proteína SERT e de seu mRNA no hipocampo, acompanhada por uma diminuição dos níveis de miR-16 (ZHAO et al., 2019). Avaliando também a atividade de antidepressivos, a administração de FLX de forma sistêmica e diretamente na rafe camundongos promove diminuição nos níveis de miR-16 no hipocampo, com consequente aumento nos níveis proteicos de SERT e linfoma de células B 2 (Bcl-2), demonstrando que a atividade neurogênica de antidepressivos no hipocampo é mediada pela relação entre miR-16 e SERT (LAUNAY et al., 2011). Curiosamente, também foi demonstrado que a resposta de SERT ao miR-16 depende de sua isoforma. Na isoforma mais longa, que confere um fenótipo ansiolítico, um sítio de ligação para uma ribonucleoproteína K nuclear heterogênea (hnRNPK) é encontrado, onde a proteína se liga e antagoniza a ligação de miR-16 (YOON et al., 2013). Assim, o papel do miR-16 na regulação da expressão de SERT está bem estabelecido, inclusive no que diz respeito à resposta aos antidepressivos.

No entanto, outros estudos também mostram outros miRs potenciais como moduladores da atividade SERT. Foi demonstrado que a família do miR-135 tem como alvo SERT e 5HT1A por meio do ensaio de luciferase *in vitro*, e que este miR-135 promove uma redução na tradução dos transcritos SERT e 5HT1A em 30 - 50% (ISSLER et al., 2014). No mesmo estudo, camundongos transgênicos que superexpressam miR-135a na rafe apresentaram redução na expressão de SERT e em menor extensão de 5HT1A (ISSLER et al., 2014). Em contraste, em camundongos *knockdown* para miR-135 especificamente na rafe, foi observado que os animais são ansiosos e têm menos resposta aos antidepressivos e níveis aumentados de SERT na rafe. Também foi demonstrado que o tratamento com antidepressivos aumenta os níveis de miR-135a nos neurônios da rafe (ISSLER et al., 2014). Corroborando a atividade do miR-135 na regulação da SERT e fisiopatologia da depressão, foi observado em tecidos *post-mortem* de humanos deprimidos que os níveis de miR-135 e miR-16 estão reduzidos na rafe dorsal e rafe magna (ISSLER et al., 2014). Além da família miR-135, SERT também foi identificado como um alvo para miR-18a-5p, miR-

34a-5p, miR-135a-5p, miR-195-5p, miR-320-3p, miR- 674-3p e miR-872-5p por meio de análise de bioinformática (ZURAWEK et al., 2017). Ratos *Wistar* submetidos a estresse crônico apresentaram aumento desses miRs na VTA, mas diminuição no PFC. Este efeito foi maior em ratos mais resistentes ao estresse do que em animais anedônicos. Além disso, o SERT mostrou-se reduzido na VTA de animais resilientes, por meio da análise de ligação à paroxetina (ZURAWEK et al., 2017).

Evidências fora do sistema nervoso central também apontam para a regulação do SERT por meio de miRNAs. Em células epiteliais da mucosa de pacientes com síndrome do intestino irritável com perfil de diarreia (IBS-D), foi observado um aumento no miR-24 e uma diminuição no mRNA de SERT (LIAO et al., 2016). O mesmo foi observado no modelo de IBS em camundongos. Além disso, a inibição do miR-24 em camundongos com IBS melhorou os sintomas e aumentou a expressão da proteína SERT (LIAO et al., 2016). Além dessas evidências no trato gastrointestinal (TGI), também foi demonstrado em estudo com tecido vascular que carótidas lesadas apresentam aumento de SERT e proliferação de tecido muscular liso, que é revertido pelo silenciamento de SERT (GU et al., 2017). Curiosamente, a presença de miR-195 foi observada em vesículas extracelulares do meio de cultura de células endoteliais e que essas vesículas carregam o miR para as células musculares lisas promovendo uma diminuição na SERT e proliferação. Dessa forma, o miR-195 modula processos relacionados à reestenose por meio da ação no SERT (GU et al., 2017). De acordo com essas evidências, fica claro que a expressão e a atividade da SERT são mediadas pela ação do microRNAs.

Além de SERT, os microRNAs modulam a atividade de outros componentes do sistema serotoninérgico, como o receptor 5HT1B. Este receptor parece ser modulado pelo miR-96, mesmo de forma variável dependendo de diferentes polimorfismos em sua estrutura genética. Dependendo do polimorfismo, miR-96 pode silenciar ou não a tradução do gene do 5HT1B (JENSEN et al., 2009). Quanto ao receptor 5HT4, a interação com microRNAs foi demonstrada tanto no sistema nervoso central quanto no TGI. No hipocampo de ratos submetidos à privação materna, foi demonstrado um aumento no miR-let-7a, acompanhado por uma diminuição na expressão da proteína 5HT4 (BAI et al., 2014). Além disso, através da análise de correlação, observou-se que a expressão de 5HT4 tem correlação positiva com a taxa de preferência pela sacarose, e que let-7a tem correlação negativa com ela, sugerindo que let-7a pode regular a atividade de 5HT4 no hipocampo e, consequentemente, hedonia por meio

da modulação 5HT4 (BAI et al., 2014). Fora do sistema nervoso central, com um estudo em células de adenocarcinoma de cólon, foi observado que miR-15b, miR-103 e a mistura de miR-15b-16-497 diminuíram a expressão de 5HT4 (WOHLFARTH et al., 2017). Em biópsias do jejuno de pacientes com IBS-D, diminuição da expressão de miR-16 e miR-103 também foi observada, o que sugere que miRNAs estão envolvidos na fisiopatologia da IBS através da regulação de receptores 5HT4 (WOHLFARTH et al., 2017). Ratos adultos submetidos a estresse na adolescência mostraram um aumento no miR-16 no hipocampo e uma diminuição no miR-135a no córtex pré-frontal associado a um aumento na expressão da proteína do 5HT1A. O tratamento com o ISRS paroxetina durante o período de estresse foi capaz de normalizar os níveis de miR-16, miR-135a e 5HT1A e até mesmo reverter as alterações comportamentais de ansiedade e memória observadas em animais submetidos ao estresse (LIU et al., 2017). Ainda sobre o receptor 5HT1A, outro estudo também demonstrou in vitro que o miR-26a-2 reprime sua expressão. Nesse mesmo estudo, também foi observado que camundongos *knockdown* para miR-26a-2 em neurônios 5HT apresentaram ansiedade e resistência à atividade antidepressiva, efeitos revertidos com o silenciamento do receptor 5HT1A (XIE et al., 2019).

Em relação à atividade dos receptores 5HT2C, o nocaute triplo (TKO) da família miRNA-34 em camundongos causou uma diminuição nos níveis de 5HT2C no hipocampo e uma ausência de aumento do fluxo de saída de 5HT no hipocampo em resposta ao estresse (ANDOLINA et al., 2020). Os animais TKO para a família miR-34 demonstraram maior resiliência à ansiedade em resposta ao estresse e maior facilidade para a extinção do medo, o que sugere que o miR-34 atua nos mecanismos de resposta ao estresse por meio da modulação dos receptores 5HT2C (ANDOLINA et al., 2016). Em um modelo de depressão por CUMS em ratos, foi observado que tanto a administração de miR-16 na rafe quanto o tratamento intragástrico de FLX diminuem os efeitos depressivos de CUMS (YANG et al., 2017). Além disso, CUMS promoveu um aumento de 5HT2A no hipocampo, que foi reduzido pela administração de miR-16 e FLX. Também foi observado que o miR-16, como a FLX, melhora a neurogênese e diminui a apoptose no hipocampo (YANG et al., 2017). O miR-29a é considerado regulador da expressão dos receptores 5HT7 no hipocampo in vivo e in vitro, causando uma diminuição em sua expressão. Nesse mesmo estudo, foi verificado que a morfogênese hipocampo mediada pelo receptor 5HT7 é mediada por miR-29a (VOLPICELLI et al., 2019).

Em estudos em humanos que investigaram os níveis séricos de microRNA em resposta ao tratamento com antidepressivos serotoninérgicos, foi mais uma vez demonstrado que existe alguma interação entre os miRs e sua atividade. Por exemplo, foi observado que o tratamento com antidepressivos serotoninérgicos causou um aumento nos níveis séricos de miR-16, miR-183 e miR-212 em pacientes com transtorno de depressão maior (MDD) (LIN et al., 2018). Além disso, os pacientes com MDD tratados com duloxetina (DLX) tiveram níveis séricos de miRs medidos e miR-23a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-146a-5p e hsa-miR-21-5p foram considerados bons preditores de pacientes responsivos ao DLX de amostras antes do início do tratamento (KIM et al., 2019). A partir da análise desses dados, podemos afirmar que há uma fina regulação epigenética de componentes do sistema serotoninérgico por meio da atividade de microRNAs.

Entretanto, o sistema serotoninérgico não é o único a apresentar essa regulação epigenética pós-transcricional por meio de microRNAs. As evidências também apontam que componentes do sistema dopaminérgico, como receptores e transportador, também são influenciados por alguns tipos de microRNAs. Na cultura de células neuronais HT-22 e na cultura primária cortical, a estimulação dos receptores DRD2 com agonista específico diminui a expressão de miR-143 de uma maneira dependente do tempo (WANG et al., 2019). Em um modelo de ratos com doença de Parkinson, observou-se que o antagonismo do miR-200a promove aumento dos níveis de DA no estriado, além de aumento no número de células tirosina hidroxilase (TH) positivas e na expressão de DRD2, o que indica que este miR pode regular a atividade dopaminérgica e do receptor DRD2 (WU et al., 2018). MiR-9 e miR-326 são os que parecem estar mais fortemente ligados à regulação dos receptores DRD2. Em ratos, o miR-9 mostrou ter como alvo o receptor DRD2, promovendo seu silenciamento (ZHANG et al., 2015). Quando submetidos ao CUMS, esses animais apresentaram aumento da expressão do gene e proteína do DRD2 acompanhado de diminuição da expressão do miR-9. A privação materna por si só promoveu um aumento na expressão do gene de DRD2 acompanhado por uma diminuição no miR-9 (ZHANG et al., 2015). Em ratos submetidos à autoadministração de oxicodona, observou-se que o aumento do miR-9 no NAc foi acompanhado por aumento do DRD2 e diminuição do consumo de drogas (MAVRIKAKI et al., 2019). Também em ratos, em um modelo de exposição fetal ao álcool, foi demonstrado que miRs 9 e 326 aumentados estão associados com DRD2 diminuído na hipófise (GANGISETTY et al.,

2017). Outro estudo também observou a associação entre miR-9 e miR-326 e o receptor DRD2 (SHI et al., 2014). Foi descoberto que miR-326 e miR-9 têm como alvo o gene DRD2 e que aumentar a expressão de miR-326 diminui a expressão de DRD2. O antagonismo de ambos os miRs promove um aumento na expressão de DRD2. Uma correlação inversa também foi observada entre esses miRs e DRD2 na diferenciação de neurônios dopaminérgicos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) de humanos (SHI et al., 2014).

Além do DRD2, são encontrados dados sobre a modulação do receptor DRD1 por miRs. Em ratos submetidos à privação materna e CUMS, foi observado um aumento na expressão de miR-504, acompanhado de uma diminuição na expressão de DRD1 e DRD2 no NAc. Além disso, miR-504 mostrou uma correlação negativa com a expressão de DRD1 e preferência por sacarose (ZHANG et al., 2013b). Em outro estudo realizado com ratos e camundongos, foi demonstrado que a diminuição na expressão de miR-105 no PFC resulta em um aumento na expressão de DRD1 em terminais glutamatérgicos projetando-se do PFC para a amígdala basolateral (ZHAO et al., 2017). Em três diferentes linhas de células humanas, miRNA-15a, miRNA-15b e miRNA-16 inibem a expressão de DRD1, respectivamente (WU et al., 2020). Além disso, também foi observado que miR-142-3p reprime a expressão de DRD1 e tem uma correlação negativa com a expressão de DRD1 no cérebro de camundongos em desenvolvimento (TOBÓN; CHANG; KUZHIKANDATHIL, 2012) e que em camundongos submetidos a um protocolo de dependência de cocaína miR-142-3p e 382 correlacionaram-se negativamente com a expressão do DRD1 no caudado putamen (TOBÓN et al., 2015).

O receptor DRD3 e o transportador dopaminérgico (DAT) também são regulados pós-transcricionalmente por microRNAs. A superexpressão de miR-let-7d em camundongos foi negativamente correlacionada com a expressão do receptor dopaminérgico DRD3 no hipocampo de camundongos. Esses resultados foram acompanhados por efeitos antidepressivos e ansiolíticos em testes comportamentais (BAHI; DREYER, 2018). Em cultura de células de neurônios dopaminérgicos, observou-se que os miRs 137 e 491 promovem uma redução na expressão de DAT (JIA et al., 2016). Além disso, o papel dos microRNAs no funcionamento dos neurônios dopaminérgicos de uma forma geral foi observado. Para tanto, foi investigada a regulação autônoma do metabolismo de miRs pela Dicer, RNase de processamento de miRs, sobre o funcionamento de neurônios DA em camundongos adultos. A

redução de Dicer nos neurônios DA no mesencéfalo ventral demonstrou mudanças no perfil miRs e alterou a capacidade de sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos (CHMIELARZ et al., 2017).

Em resumo, de acordo com as evidências encontradas na literatura, podemos observar que os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico sofrem regulação de sua atividade por meio da modulação pós-transcricional por microNRAs. Ambos os sistemas participam dos processos fisiológicos e patológicos do comportamento alimentar, o que nos leva a crer que os microRNAs podem estar por trás de diversas mudanças no comportamento alimentar, conforme observado em diversos transtornos como a obesidade. Vários estudos apontam que a gênese desses transtornos está amplamente associada a experiências de estresse no início da vida. O estresse neonatal já é bem descrito como um modulador dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico associado aos transtornos do comportamento alimentar, bem como um modulador da expressão e atividade de miRNAs (TAVARES; TORRES; DE SOUZA, 2020). Além disso, sabemos que os microRNAs participam dos processos patológicos de diversos transtornos psiquiátricos. Assim, estabelecemos aqui uma relação entre o estresse neonatal e a modulação dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, por meio da regulação pós-transcricional por miRs, como um possível mecanismo fisiopatológico por trás dos transtornos do comportamento alimentar. Estudos futuros são necessários para investigar essa relação e fornecer mais subsídios para a comunidade científica na busca pela compreensão e tratamento das patologias do comportamento alimentar.

2.6 SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE MICRORNAs COMO POSSÍVEL ESTRATÉGIA DE INTERVENÇÃO EPIGENÉTICA NO CONTEXTO DO ESTRESSE PERINATAL

Devido ao crescente número de evidências demonstrado que as redes neurais e o neurodesenvolvimento dos organismos são sujeitos à modulação por fatores ambientais durante o desenvolvimento, e que isto está ligado à gênese de várias patologias, a academia tem levantado esforços na busca de intervenções preventivas e terapêuticas. A utilização de nanovesículas para a administração de intervenções preventivas e terapêuticas surge neste contexto, principalmente pela capacidade de transporte de moduladores até mesmo em nível epigenético.

Exossomos pertencem à classe das vesículas extracelulares (VEC), as quais são ligadas à membrana celular e liberadas para o espaço extracelular. É bem sabido

que estas vesículas são formadas através do brotamento das membranas celulares em endossomos, levando à formação de vesículas intraluminares, e em seguida à formação de complexos multivesiculares. Estes complexos ligam-se, por sua vez, à membrana celular, promovendo a liberação de vesículas no meio extracelular (KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014). Por outro lado, as microvesículas, que são outra classe de vesículas extracelulares, são formadas por brotamento direto da membrana celular. Normalmente, os exossomos têm 30-100nm de diâmetro, assemelhando-se ao tamanho das vesículas intraluminais, enquanto as microvesículas são maiores que 100nm (BATRAKOVA; KIM, 2015; KISHORE; KHAN, 2016). Por muito tempo acreditou-se que os exossomos eram nada mais do que uma forma de a célula excretar substâncias inúteis, “lixo celular”, até vários estudos demonstrarem que na verdade são meios de comunicação intracelular. Os Exossomos são utilizados como mediadores intracelulares através do transporte de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos ou até mesmo outras substâncias, sejam posicionados na bicamada lipídica ou mesmo dentro do exossomo (LI et al., 2018).

Devido à esta importante função, a utilização terapêutica destas vesículas extracelulares tem sido amplamente estudada. A função terapêutica das vesículas extracelulares pode se dar de três formas: endógena, através de vesículas naturalmente produzidas pelas células; através de vesículas produzidas endogenamente por células modificadas; ou através de vesículas exógenas contendo substâncias exógenas (KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014). Recentemente, Beuzelin et al. (2019) descreveram uma metodologia de elaboração de vesículas sintéticas, formadas por aminoglicosídeos, sendo eles dioleil-succinil-paromomicina (DOSP), dioleil-succinil-serinil-tobramicina (DOSST), dioleil-succinil-ribostamicina (DOSRI) e dioleil-succinil-serinil-ribostamicina (DOSSRI). Neste mesmo estudo, o transporte destas vesículas foi realizado através de suplementação oral de uma alta dose, e neste contexto o DOST se mostrou o aminoglicosídeo mais efetivo para esta função (BEUZELIN; PITARD; KAEFFER, 2019).

Naturalmente, as vesículas extracelulares carregam uma grande quantidade de microRNAs, os quais modulam as atividades das células alvos em diversos contextos, como câncer, doenças cardíacas e metabólicas (BEUZELIN; KAEFFER, 2018; LI et al., 2018)b. Por esta razão, torna-se bastante relevante a investigação da utilização de microRNAs embebidos em vesículas extracelulares como estratégia de intervenção preventiva/terapêutica. Em um artigo de revisão, Li et al. (2018)

descreveram vários microRNAs sendo utilizados embebidos em vesículas extracelulares no contexto do tratamento do câncer, seja por suplementação oral, injeção *in situ*, injeção intravenosa, injeção intraperitoneal ou até mesmo inalação (LI et al., 2018). Porém, dentre estes meios de administração, a forma oral aparentemente seria um melhor método por ser menos invasivo e mais prático para o uso clínico (LI et al., 2018). Beuzelin et al. (2019) demonstram por exemplo que a suplementação oral com o miR-320-3p em ratos é eficiente, absorvida pelo trato gastrintestinal e impacta vários aspectos do metabolismo (BEUZELIN; PITARD; KAEFFER, 2019). Especificamente, a suplementação oral do miR-320-3p através de nano vesículas impacta a interferência de RNA (RNAi) e complexos de cromatina nuclear, dependendo inclusive do ritmo circadiano (BEUZELIN; PITARD; KAEFFER, 2019).

Em artigo de revisão de literatura, Beuzelin & Kaeffer (2018) apontam o miR-320-3p como um forte candidato na utilização terapêutica/preventiva visando prevenir o surgimento de distúrbios metabólicos. Além disso, os autores sugerem que devido às funções deste microRNAs, como por exemplo o silenciamento da subunidade RPC4 da RNA polimerase III (polr3d), este pode inclusive agir como um “reprogramador” do desenvolvimento, no contexto de experiências ambientais negativas, como privações nutricionais (BEUZELIN; KAEFFER, 2018).

3 HIPÓTESES

- 3.1 O desmame precoce promove hiperfagia e aumento de ingestão de alimento palatável em ratos adultos, além de modular a expressão gênica de componentes de sistemas de neurotransmissão relacionados com o controle central do comportamento alimentar no hipotálamo e tronco encefálico.
- 3.2 O aumento ou diminuição da expressão de genes dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico em resposta ao desmame precoce estão associados com diminuição ou aumento, respectivamente, da expressão de microRNAs que os regulam.
- 3.3 A suplementação oral de mir-320-3p e miR-375-3p durante o período neonatal é uma estratégia nutricional visando a prevenção das modificações moleculares promovidas pelo desmame precoce.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar os efeitos do desmame precoce e da suplementação oral pós-natal com os microRNAs 320 e 375 sobre parâmetros comportamentais, neurobiológicos e epigenéticos, do comportamento alimentar.

4.2 ESPECÍFICOS

Estudar em ratos de ambos os sexos:

- Massa corporal e ingestão de alimento padrão e palatável em resposta ao desmame precoce;
- Expressão gênica de componentes centrais do controle do comportamento alimentar no hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico em resposta ao desmame precoce;
- Relação entre a expressão de microRNAs e a expressão de mRNAs de componentes centrais do comportamento alimentar em resposta ao desmame precoce.
- Efeitos da suplementação oral neonatal com miR-320-3p e miR-375-3p sobre a expressão de miRNAs e mRNAs relacionados ao controle do comportamento alimentar.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 EXPERIMENTO I – ESTUDO DOS EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR, SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO DE RATOS ADULTOS

5.1.1 Animais

Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE de acordo com os preceitos da lei editados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), segundo o processo 0020/2018 (apêndice 1). Foram utilizadas oito ratas albinas (200-250g de peso corporal) da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As ratas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozoide no esfregaço vaginal e confirmada pelo ganho de peso corporal. A partir do diagnóstico, as ratas prenhas foram transferidas para gaiolas individuais, e durante a gestação e lactação receberam dietas padrão de biotério (Presence ®) (Ver composição nutricional na tabela 1). Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes por mãe, 4 machos e 4 fêmeas. Para a composição dos grupos experimentais, no máximo 3 filhotes de cada sexo de cada ninhada foram utilizados. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições padrão de biotério (temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18 horas), recebendo ração (Presence ®) (Ver composição nutricional na tabela 1) e água *ad libitum*.

Tabela 1 – Composição nutricional da dieta utilizada no estudo I (Presence ®).

Macronutrientes	
Carboidratos	44g/100g*
Proteínas	23g/100g
Gorduras	4,5g/100g
Umidade	
Umidade	13%
Fibra dietética	
Fibra bruta	5g/100g
Micronutrientes	
Matéria mineral	10g/100g
Vitamina A	2.550,00UI/100g
Vitamina D3	400UI/100g
Vitamina E	8,2UI/100g

Vitamina K3	0,64mg/100g
Vitamina B1	1,1mg/100g
Vitamina B2	1,2mg/100g
Niacina	21,9mg/100g
Ácido pantotênico	9mg/100g
Vitamina B6	1,1mg/100g
Ácido fólico	1,3mg/100g
Biotina	0,01mg/100g
Vitamina B12	4mg/100g
Colina	280mg/100g
Lisina	1,25g/100g
Metionina	350mg/100g

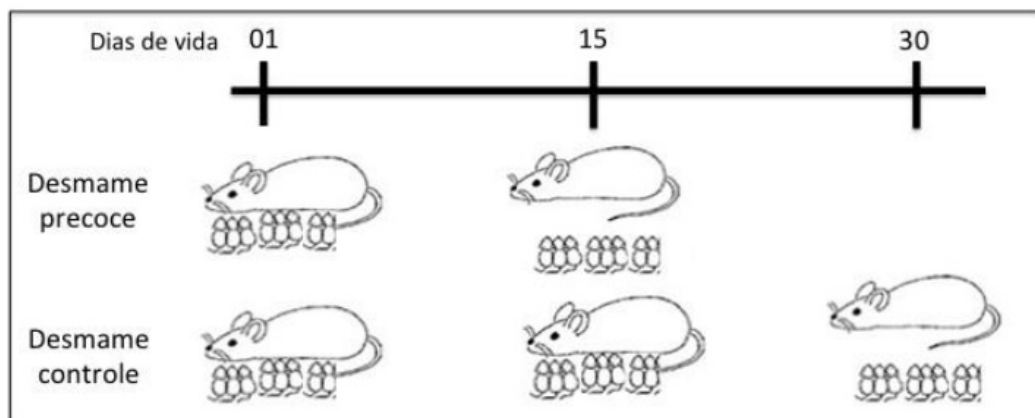
*Valor estimado por diferença

Fonte: Presence® Nutrição animal

5.1.2 Desmame precoce

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado dia zero. No primeiro dia pós-natal, foram mantidos 4 filhotes machos e 4 fêmeas em cada ninhada. Para obtenção dos grupos experimentais, os filhotes de diferentes ninhadas foram desmamados em períodos distintos. O desmame precoce através da separação materna em ratos é considerado quando há interrupção do aleitamento por volta do 15º dia de idade, e o natural, como ocorre na natureza, aos 30 dias de vida (KIKUSUI; MORI, 2009; NOVÁKOVÁ et al., 1962). Sendo assim, o desmame precoce ocorreu no 15º dia pós-natal. Este modelo caracteriza uma forma de estresse mista, emocional e nutricional, uma vez que priva os filhotes do cuidado e do leite materno, ambos fundamentais para o neurodesenvolvimento da prole (KANARI et al., 2005; LIU et al., 1997; TAVARES et al., 2019). A prole desmamada precocemente foi alocada em gaiola com recipiente contendo ração triturada no assoalho e também pellets de ração no próprio *dispenser* da gaiola, uma vez que aos 14-15 dias de vida os animais já possuem a habilidade e iniciam o consumo alimentos provenientes do ambiente, além do leite materno (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; LOPES DE SOUZA et al., 2004). O desmame natural ocorreu ao 30º dia pós-natal. No período do 15º ao 30º dia pós-natal os animais desmamados naturalmente tiveram acesso ao leite e cuidado materno e também pellets de ração no *dispenser* da gaiola. A partir do 30º dia pós-natal, ambos animais desmamados precoce e naturalmente tiveram acesso a ração através do *dispenser* da gaiola. A figura 1 ilustra o modelo experimental de desmame precoce utilizado neste estudo.

Figura 1 – Esquema metodológico do desmame precoce adotado neste estudo.



Fonte: Tavares (2018, p. 27)

5.1.3 Grupos experimentais

Um total de 38 animais machos e fêmeas foram usados para compor os grupos experimentais, formados de acordo com o dia do desmame, 15 ou 30 dias pós-natal:

- Grupo Controle, macho (CM) ou fêmea (CF) - desmamado no período natural para a espécie, 30º dia pós-natal;
- Grupo desmamado precocemente, macho (DM) ou fêmea (DF) – animais desmamados no 15º dia pós-natal.

5.1.4 Ingestão alimentar de alimento padrão em resposta à privação alimentar

Ratos de ambos os sexos com idade entre 250 e 300 dias, dos diferentes grupos experimentais, foram submetidos à análises de consumo alimentar de alimento padrão em resposta a privação alimentar. Os ratos foram mantidos previamente em gaiolas individuais por 7 dias consecutivos antes deste estudo. No dia do teste, os animais foram submetidos a privação alimentar de 4 horas, a partir das 12h (n = 6-8 animais por grupo). Findas as 4h do período de privação, às 16h, foi ofertada uma quantidade conhecida de ração, e após uma hora (17h) foi aferido o peso de ração restante no *dispenser* da gaiola. O consumo alimentar foi mensurado pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante ao final de uma hora. Estes horários foram escolhidos uma vez que os maiores picos de alimentação em 24h no rato é observado no início e no final da fase escura, desta forma o fim da fase escura é um horário em que o animal já sente fome naturalmente (PATTON; MISTLBERGER, 2013).

5.1.5 Ingestão alimentar de 24h e por fases do ciclo circadiano

Entre 250 e 300 dias de vida os animais foram submetidos a teste de ingestão alimentar ao longo do ciclo circadiano ($n = 7 - 9$ por grupo). A quantidade de ração ofertada aos animais foi pesada às 06h, 18h e 06h do dia seguinte. A diferença de ingestão entre 06h e 06h do dia seguinte foi considerada a ingestão de 24h. A diferença entre às 06h e 18h, e entre 18h e 06h caracterizaram os consumos na fase escura e clara, respectivamente.

5.1.6 Ingestão alimentar de alimento palatável

Entre 250 e 300 dias de vida os animais de ambos os grupos (apenas machos) foram submetidos a avaliação do consumo de alimento palatável (Cookies de chocolate), durante três dias consecutivos, por uma hora ($n = 8$ por grupo). O consumo correu sempre no mesmo horário, estabelecido entre 13h e 14h, horário em que não há pico de alimentação, demonstrando o consumo alimentar sem ser em estado de fome (PATTON; MISTLBERGER, 2013). Durante esta faixa de horário, a ração padrão foi removida do *dispenser* da gaiola e os cookies foram adicionados. Os dois primeiros dias de teste foram considerados a adaptação do animal a um novo alimento, e o consumo do terceiro dia foi considerado. O consumo alimentar foi mensurado pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante ao final de uma hora.

5.1.7 Avaliação da massa corporal

A massa corporal dos animais (gramas) foi avaliada entre as idades 250 – 300 durante a fase escura ($n = 7 - 11$ por grupo). Para a avaliação da massa corporal foi utilizada balança digital (Marte Ad1000, com capacidade máxima de 1010g e divisão mínima de 0,01g).

5.1.8 Avaliação de parâmetros metabólicos

Entre os dias 250 e 300 de vida, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram coletados o sangue do tronco, fígado e gordura abdominal ($n = 6 - 11$ por grupo). O peso do fígado e da gordura abdominal foram mensurados e o sangue do tronco foi centrifugado durante 5 minutos a $903 \times g$ para a obtenção do plasma sanguíneo, o qual foi utilizado para analisar os níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicerídeos. Para as análises bioquímicas foi utilizado um

analisador automático (PIOWAY – modelo PW2280) e kits comerciais de diagnóstico (Biotecnic®) para glicose, triglicerídeos e colesterol total.

5.1.9 PCR em tempo real

Para associar os resultados aos testes de ingestão alimentar, os animais foram eutanasiados entre 250 e 300 dias de idade (foram coletados hipotálamo e tronco encefálico) ($n = 3 - 6$ por grupo). Para isto, os animais foram eutanasiados por decapitação dentro da faixa de horário de 16h às 17h e as estruturas foram seccionadas e armazenados a -20°C . O RNA total das amostras foi obtido pelo método de extração com isotiocionato de guanidina usando o reagente TRIzol. Inicialmente os tecidos foram lisados utilizando o TRIzol. Depois de 5min de incubação, à temperatura ambiente, foi acrescentado clorofórmio nas amostras e em seguida centrifugadas a 1200RPM por 15min. A fase aquosa obtida foi transferida para outro tubo, adicionada de isopropanol gelado sendo incubada por 10min e em seguida centrifugada a 12000RPM por 10min. O RNA formado foi então lavado com etanol a 75% e centrifugado a 7000RPM por 5min. O sedimento de RNA (pellet) foi então ressuspenso em água livre de RNase e armazenado. A quantificação de RNA foi realizada em duplicata diluindo as amostras em proporção de 1:50 em água livre de RNase. A absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a análise de pureza do RNA, o valor da absorbância obtido a 260nm foi dividido pelo obtido a 280nm e as amostras que apresentaram razão de 260/280 igual ou superior a 1,8 foram utilizadas (indicativo de elevado grau de pureza).

O PCR em tempo real foi realizado com kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System, número de referência A6020 (Promega, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, foram utilizadas concentrações de 700ng de RNA, 10 μmol de primer e duas unidades de Taq polimerase, com volume final de reação de 15 μl . Os primers utilizados para este estudo estão descritos na tabela 1. As análises foram performadas em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, USA)

Tabela 2 – Sequências dos primers utilizados para as análises de expressão gênica de 5ht1b, 5ht2c, Sert, Drd1, Drd2, Npy, Pomc e gene de referência $\beta 2M$.

Primer	Forward (5' - 3')	Reverse (5' – 3')	Ref.*
5ht1b	AGAAGAACTCATGGCCGCT	GGGGAGCCAGCACACAATAA	NM_012765.3
5ht2c	ATTTGTGCCCCGTCTGGATT	CGCGAATTGAACCGGCTATG	NM_012765.3
Sert	AGCATCTGGAAAGGCGGTCAA	ACACCCCTGTCTCCAAGAGT	NM_013034.4
Drd1	GTTTGTGTGGTTTGGGTGGG	GCTCATGGTGGCTGGAAAAC	NM_012546
Drd2	GAGCCAACCTGAAGACACCA	GCATCCATTCTCCGCCTGTT	NM_012547
Npy	AGAGATCCAGCCCTGAGACA	AACGACAACAAGGGAAATGG	NM_012614.2
Pomc	CCTATCGGGTGGAGCACTTC	GCGTTCCTTGATGATGGCGTT	NM_139326.2
$\beta 2M$	TGACCGTGATCTTTCTGGTG	ACTTGAATTTGGGGAGTTTTCTG	NM_012512.2

*Número de referência no PUBMED.

Fonte: Tavares (2021)

5.1.10 Análises estatísticas

Two-way ANOVA com pós-teste de *tukey* foi utilizado para a análise dos resultados compostos por dois fatores (Desmame precoce x sexo). Para os resultados compostos de apenas um fator (desmame precoce), o teste t foi utilizado. Unicamente para as análises do consumo alimentar por fases do ciclo circadiano, *three-way* ANOVA com pós-teste de *tukey* foi utilizado, tendo como fatores o desmame precoce, o sexo e a fase do ciclo. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$, e os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Para a realização das análises foi utilizado o software *GraphPad Prism* v.8.

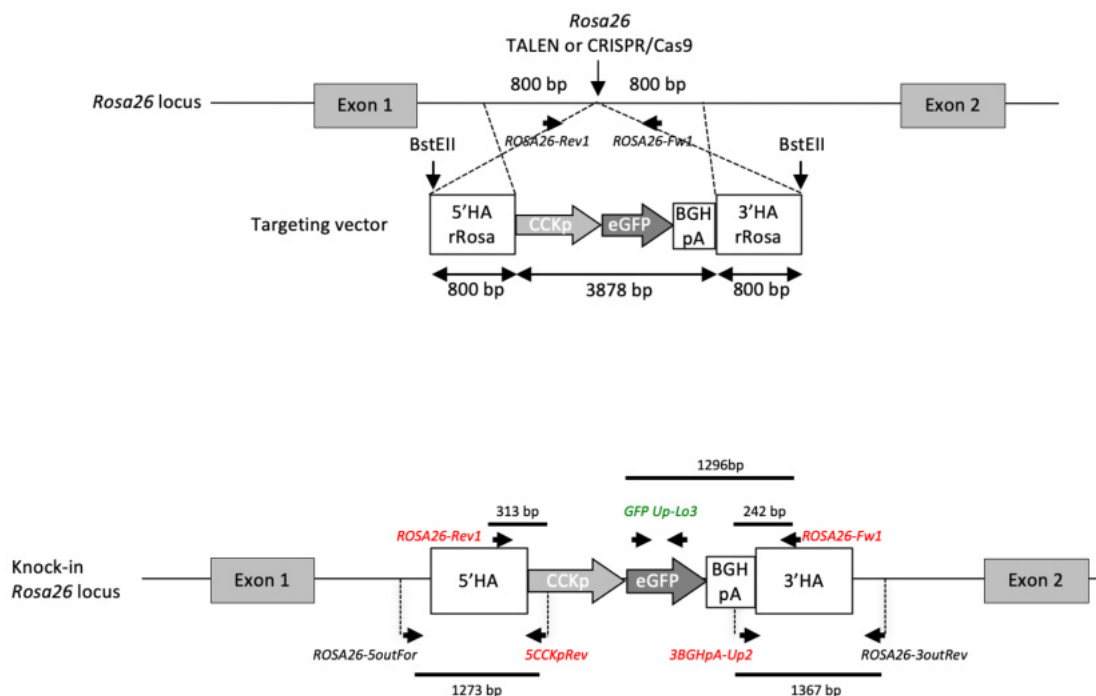
5.2 EXPERIMENTO II – EFEITOS MOLECULARES DO DESMAME PRECOCE E SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MIR-320-3P E MIR-375-3P SOBRE O CÉREBRO DE RATOS

5.2.1 Animais

Para esta parte dos procedimentos experimentais, ratos *Sprague-dawley* foram utilizados. Estes ratos foram geneticamente modificados com a inserção do promotor do gene da proteína verde fluorescente (GFP) na região promotora do gene da colecistoquinina (CCK). A escolha da região de inserção do gene GFP foi baseada no fato de que o miR-375-3p, utilizado para suplementação destes animais, como mencionado posteriormente, participa na diferenciação de células neuroendócrinas (ABRAHAM et al., 2016; PANARELLI et al., 2019; YAN et al., 2017), além de que as

populações de neurônios produtores de CCK participam da regulação da ingestão alimentar, produzindo saciedade (ROMAN; SLOAT; PALMITER, 2017). Para a realização do procedimento da transgenia, foi utilizada a metodologia descrita por Tesson et al. (2011), que consiste na inserção de um vetor contendo a sequência do gene desejado construído para se ligar especificamente na região alvo, podendo ser utilizado para a inserção ou silenciamento de genes (TESSON et al., 2011). No caso deste estudo, nucleases efetoras semelhantes a ativador de transcrição altamente ativo foram utilizadas para promover a inserção do gene GFP onde é expresso naturalmente o gene da CCK, processo que está descrito na figura 2. A injeção do vetor foi realizada na fase embrionária unicelular. Após obtenção dos animais comprovadamente transgênicos, seis ratas homozigotas para o transgene foram acasaladas com machos também homozigotos para o transgene. As ratas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozoide no esfregaço vaginal e confirmada pelo ganho de peso corporal. A partir do diagnóstico, as ratas prenhas foram transferidas para gaiolas individuais, e durante a gestação e lactação receberam dieta padrão de biotério. Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes por mãe, 4 machos e 4 fêmeas. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições padrão de biotério (temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 16:30h, luzes apagadas às 04:30h), recebendo ração padrão de biotério (SAFE® A03 durante gestação e lactação e SAFE® A04 para manutenção (ver composições nutricionais nas tabelas 3 e 4) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da região *Pays de La Loire*, França, sob protocolo APAFIS 21917.

Figura 2 – Ilustração demonstrando o modelo de inserção do gene GFP na região promotora do gene CCK para criação do rato transgênico.



Fonte: Tesson, Plataforma de Ratos transgênicos e de imunofenômica de Nantes.

Tabela 3 – Composição nutricional da dieta utilizada durante a gestação e lactação no estudo II - SAFE® A03.

Macronutrientes	
Carboidratos	48,8g/100g*
Proteínas	21,4g/100g
Gorduras	5,1g/100g
Umidade e cinzas	
Umidade	12,1%
Cinzas	5,4%
Fibra dietética	
Fibra bruta	4g/100g
Micronutrientes	
Matéria mineral	3,2g/100g
Vitamina A	1.400,00UI/100g
Vitamina D3	200UI/100g
Vitamina E	5UI/100g
Vitamina K3	0,57mg/100g
Vitamina B1	0,8mg/100g
Vitamina B2	1,3mg/100g
Vitamina B3	9mg/100g

Vitamina B5	1,5mg/100g
Vitamina B6	0,35mg/100g
Vitamina B9	0,05mg/100g
Vitamina B12	0,002mg/100g
Biotina	0,01mg/100g
Colina	210mg/100g

*Valor estimado por diferença

Fonte: SAFE® *Premium scientific diets*

Tabela 4 – Composição nutricional da dieta de manutenção utilizada no estudo II - SAFE® A04.

Macronutrientes	
Carboidratos	57,7g/100g*
Proteínas	16,1g/100g
Gorduras	3,1g/100g
Umidade e cinzas	
Umidade	11,9%
Cinzas	4,6%
Fibra dietética	
Fibra bruta	3,9g/100g
Micronutrientes	
Matéria mineral	2,7g/100g
Vitamina A	750UI/100g
Vitamina D3	100UI/100g
Vitamina E	3UI/100g
Vitamina K3	0,25mg/100g
Vitamina B1	0,5mg/100g
Vitamina B2	0,65mg/100g
Vitamina B3	7mg/100g
Vitamina B5	1mg/100g
Vitamina B6	0,3mg/100g
Vitamina B9	0,035mg/100g
Vitamina B12	0,001mg/100g
Biotina	0,008mg/100g
Colina	160mg/100g

*Valor estimado por diferença

Fonte: SAFE® *Premium scientific diets*

5.2.2 Suplementação oral de miR-320-3p, miR-375-3p e desmame precoce

No dia pós-natal 12, três ninhadas foram designadas aleatoriamente a compor os grupos de animais submetidos à suplementação oral com miR-320-3p e miR-375-3p. Para isto, os filhotes foram separados das mães durante período de 1h, com o objetivo de promover o esvaziamento gástrico. A separação ocorreu na fase escura, às 06:00h. Uma hora após a separação (07:00h), os animais foram submetidos à suplementação de solução contendo os miR-320-3p ou miR-375-3p embebidos em lipoaminoglicosídeo que serve como veículo, biomimetizando vesículas

extracelulares, o Dioleil-Succinil Paromomicina (DOSP). A suplementação foi realizada através de gavagem, com volume de 300µL, contendo 0,5nM de microRNAs, o que corresponde a 9×10^{10} moléculas. Durante período de 15 minutos após a suplementação (07:00h – 07:15h) os animais permaneceram separados das mães, quando finalmente foram devolvidos. Para ter controle sobre o estresse da separação, todas as outras ninhadas que não foram submetidas à suplementação foram submetidas ao mesmo tempo de separação no dia 12 de idade.

Os procedimentos para a realização do desmame precoce foram realizados como descrito no tópico 5.1.2. Brevemente, os animais foram desmamados em idade regular (D30) ou precoce (D15). No caso dos ratos sprague-dawley, a alimentação dos grupos desmamados precocemente entre os dias 15 e 30 foi realizada através da elaboração de uma solução pastosa de ração triturada e água disposta em recipiente no assoalho da gaiola, além da ração sólida normalmente ofertada no dispensador da gaiola.

5.2.3 Grupos experimentais

48 animais foram utilizados para compor os grupos experimentais, os quais foram formados a partir de 6 ninhadas distribuídas de forma aleatória, de acordo com a suplementação, idade do desmame e sexo, como disposto a seguir:

- Controle macho (CM) (n=4) e fêmea (CF) (n=4); desmame regular sem suplementação.
- Controle macho (CM320) (n=4) e fêmea (CF320) (n=4) com suplementação de miRT-320-3p; desmame regular com suplementação de miR-320-3p.
- Controle macho (CM375) (n=4) e fêmea (CF375) (n=4) com suplementação de miRT-375-3p; desmame regular com suplementação de miR-375-3p.
- Desmame precoce macho (DM) (n=8) e fêmea (DF) (n=8); desmame precoce sem suplementação.
- Desmame precoce macho (DM320) (n=4) e fêmea (DF320) (n=4) com suplementação de miR-320-3p; desmame precoce com suplementação de miR-320-3p.

5.2.4 Obtenção e preparação dos tecidos

Os animais foram eutanasiados na idade 45 através de decapitação, entre 10:00h e 11:00h, durante a fase escura. O crânio foi imediatamente removido e o cérebro exposto, quando foram obtidas as amostras do hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico dos animais. Os tecidos foram imediatamente armazenados em temperatura de -80°C e em seguida foram processados para as análises de expressão gênica.

A extração do RNA total dos tecidos foi realizada através do sistema de lise utilizando Qiazol®. 1mL de Qiazol foi adicionado para cada 30mg de tecido congelado durante 5min para a descongelação do tecido. Após descongelados, os tecidos foram homogeneizados com a ajuda de um homogeneizador de amostras automático (PRECELLYS® Evolution), com dois processamentos de 30s a 6500rpm com intervalo de 10s de pausa entre eles. Após 5min em temperatura ambiente, 200mL de clorofórmio foram adicionados à solução, a qual foi em seguida homogeneizada com ajuda de um vórtex e centrifugada a 1200rpm e 4°C durante 15min. A partir da centrifugação, três fases foram obtidas na solução, e a fase superior, translúcida, a qual contém o RNA total foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo. A solução de RNA coletada foi homogeneizada com 500mL de isopropanol, sendo incubada em seguida durante 10min em temperatura ambiente. Após a incubação, a solução foi novamente centrifugada a 1200rpm e 4°C durante 15min. Com esta última centrifugação foram obtidos os pellets de RNA no fundo dos tubos, os quais foram lavados em 1mL de álcool 70% e novamente centrifugados a 7500rpm e 4°C durante 5min. Uma segunda lavagem dos pellets foi realizada em seguida com 500mL de álcool 70% e novamente centrifugado como da última vez. Após esta última lavagem em álcool, o álcool foi removido do tubo e o pellet foi ressuspenso em água livre de RNase. A quantificação de RNA foi realizada em duplicata diluindo as amostras em proporção de 1:50 em água livre de RNase.

A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a análise de pureza do RNA, o valor da absorbância obtido a 260nm foi dividido pelo obtido a 280nm e as amostras que apresentaram razão de 260/280 igual ou superior a 1,8 foram utilizadas (indicativo de elevado grau de pureza).

5.2.5 PCR em tempo real

Antes de proceder com o PCR, as amostras de RNA foram submetidas à reação de transcriptase reversa para a construção do cDNA. Para isto foi utilizado o kit de síntese de cDNA para miRNA e mRNA TaqMan® (Ref. A28007). O processo de construção do cDNA foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, o kit consiste de quatro reações. A primeira reação é a da enzima Poly(A), na qual uma solução contendo tampão, adenosina trifosfato (ATP), enzima Poly (A) e água livre de RNase foi preparada. Um volume final de 5mL, composto de 3mL de solução poly(A) e 2mL de solução de RNA é utilizado para a reação. Após a reação da poly(A), a segunda etapa é a reação de ligação. Nesta foi preparada uma solução contendo tampão, PEG-8000, adaptador de ligação, RNA ligase e água livre de RNase. 10mL desta solução foram adicionados à solução prévia, resultando em volume final de 15mL. A terceira reação é a de transcrição reversa, na qual foi preparada solução contendo tampão, mix de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), primer universal, mix de enzimas e água livre de RNase. 15mL desta solução foram adicionados aos 15mL provenientes da reação de ligação, resultando em volume final de 30mL. Ao final desta etapa, obtemos o cDNA para análises de expressão de mRNA. Na próxima e última etapa foi realizada a reação dos microRNAs. Neste caso, foram utilizados master mix miR-Amp, primer mix miR-Amp e água livre de RNase. 45mL desta solução foram misturados com 5mL da solução da reação de transcrição reversa, gerando o cDNA para os microRNAs.

Uma vez prontos os cDNAs dos mRNAs e microRNAs, procedemos com a PCR em tempo real. Para isto utilizamos o sistema BioRad®, com o aparelho CFX Connect™ e placas de 96 poços. Para os mRNAs, utilizamos o sistema SYBR® Green com solução de reação contendo 1µL de água livre de RNase, 6 µL de SYBR® Green, 2 µL de primer *forward* e 2 µL de primer *reverse*. Desta solução, 9 µL são utilizados e adicionados de 1 µL de cDNA, formando 10 µL de volume final de reação. Para as análises de microRNAs, foi utilizado o sistema TaqMan®. Para a realização da solução de reação foram utilizados 4,5 µL de água livre de RNase, 5,75 µL de master mix TaqMan e 0,5 µL de primer TaqMan. Deste volume de reação, 9 µL foram utilizados e adicionados de 1 µL do cDNA.

Os primers utilizados para este estudo estão descritos nas tabelas 2 e 3. Os resultados foram analisados em forma de expressão relativa ($\log_{10}$ de ΔCT) aos 3

genes de referência para os mRNAs e microRNAs. Todos os genes foram avaliados nas três regiões, exceto pelo SERT, que foi avaliado apenas no tronco encefálico.

Tabela 5 – Primers utilizados para análises de expressão de mRNA com sistema SYBR®, incluindo os 3 genes de referência β 2M, GAPDH e β -actina.

Primer	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
<i>5ht1b</i>	AGAAGAAACTCATGGCCGCT	GGGGAGCCAGCACACAATAA
<i>5ht2c</i>	ATTTGTGCCCCGTCTGGATT	CGCGAATTGAACCGGCTATG
<i>Drd1</i>	GTTTGTGTGGTTTGGGTGGG	GCTCATGGTGGCTGGAAAAC
<i>Drd2</i>	GAGCCAACCTGAAGACACCA	GCATCCATTCTCCGCCTGTT
<i>Clock</i>	GAACTTGGCGTTGAGGAGTCT	GTGATCGAACCTTTCCAGTGC
<i>Period1</i>	GCCGTGCTGCCTGCTCATTG	AACTTGGTGTGTGCCGTGTGG
<i>Period2</i>	GCACGCTGGCAACCTTGAAG	GGCTGGCTCTCACTGGACATTAG
<i>Bmal1</i>	GACTTCGCCTCCACCTGTTC	CATTGTCTGGTTCACTGTCTTCG
<i>Cck</i>	GCCGCCTGCCCTCAAC	ACACACGCCGCACTTCATATC
<i>Gfp</i>	AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC	CTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAA
β 2M	TGACCGTGATCTTTCTGGTG	ACTTGAATTTGGGGAGTTTCTG
<i>Gapdh</i>	CGGCAAGTTCAACGGCACAG	TCCACGACATACTCAGCACCA
<i>βactina</i>	CTATCGGCAATGAGCGGTTCC	GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC

Fonte: Tavares (2021)

Tabela 6 – Primers utilizados para análises de expressão de mRNA e miRNA com sistema TaqMan®, incluindo os genes de referência para os miRNAs, miR-let-7g, miR-let-7d e miR-146-5p.

Primer	Referência TaqMan®
<i>Sert</i>	rn00564737_m1
<i>miR-320-3p</i>	rno481048_mir
<i>miR-375-3p</i>	rno481141_mir
<i>miR-132-3p</i>	rno480919_mir
<i>miR-16-5p</i>	rno481312_mir
<i>miR-504</i>	rno481198_mir
<i>miR-let-7g</i>	rno478580_mir
<i>miR-let-7d</i>	rno478439_mir
<i>miR-146-5p</i>	rno480941_mir

Fonte: Tavares (2021)

5.2.6 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos resultados, o teste ANOVA two-way foi utilizado tendo como fatores desmame e sexo, para as análises do efeito do desmame precoce sobre os parâmetros moleculares. Já para os efeitos da suplementação, os fatores foram considerados desmame + suplementação e sexo. O pós-teste de tukey também foi utilizado em ambas as análises. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$, e os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Para a realização das análises foi utilizado o software *GraphPad Prism* v.8.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO I - ESTUDO DOS EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR, SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO DE RATOS ADULTOS

6.1.1 Efeitos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar de ratos machos e fêmeas adultos

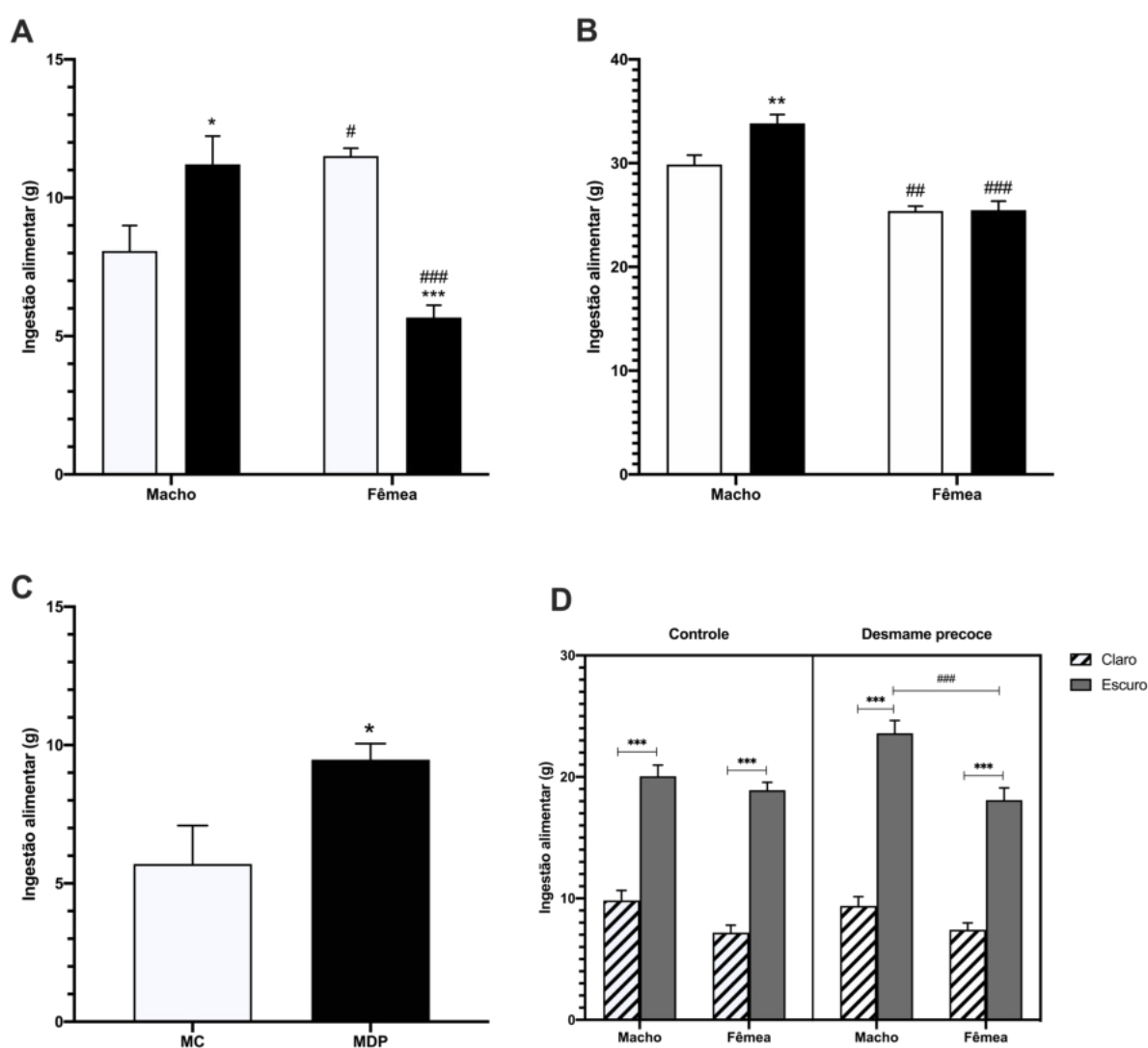
No teste de ingestão alimentar em resposta à privação alimentar de 4h, o teste ANOVA *two-way* demonstrou interação entre os dois fatores (desmame precoce vs sexo) [$F(1, 25) = 33,57, p < 0,0001$]. O pós-teste de *tukey* demonstrou aumento na ingestão alimentar de MDP ($p = 0,0344$), em comparação a MC, e diminuição da ingestão alimentar em FDP ($p = 0,0001$), em comparação a FC (Fig. 3A). Além disso, o pós-teste de *tukey* também apresentou aumento de ingestão alimentar em FC ($p = 0,0303$), quando comparadas à MC, porém diminuição de ingestão alimentar em FDP ($p < 0,0001$), quando comparadas a MDP (Fig. 3A).

Por outro lado, no teste de ingestão alimentar em um período de 24h, ANOVA *two-way* também apresentou interação entre sexo e desmame precoce [$F(1, 30) = 4,999, p = 0,0329$]. O pós-teste de *tukey*, por outro lado, demonstrou aumento de ingestão em MDP ($p = 0,0100$), quando comparados a MC, e menor ingestão alimentar em FC ($p = 0,0088$) e FDP ($p < 0,0001$), quando comparadas à MC e MDP, respectivamente (Fig. 3B).

Quando submetidos ao teste de ingestão de alimento palatável, o teste *t* de *student* demonstrou que MDP apresentou maior consumo de cookies ($p = 0,0325$), quando comparado a MC (Fig. 3C).

No teste de ingestão alimentar por fase do ciclo circadiano, ANOVA *three-way* de medidas repetidas não demonstrou interação entre os três fatores, desmame precoce, sexo e fase do ciclo [$F(1, 28) = 3,553, p = 0,0699$]. Em todos os grupos, MC ($p < 0,0001$), MDP ($p < 0,0001$), FC ($p < 0,0001$) e FDP ($p < 0,0001$), foi observado, através do teste de *tukey*, maior consumo alimentar na fase escura do ciclo, quando comparada à fase clara. Além disso, na fase escura do ciclo, FDP ($p = 0,0005$) apresentou menos consumo alimentar do que MDP (Fig. 3D)

Figura 3 – Efeitos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar de ratos adultos de ambos os sexos. Ratos de ambos os sexos foram desmamados regularmente (PND30) ou precocemente (PND15), e entre 230 – 250 dias de vida foram submetidos a teste de ingestão alimentar em resposta à privação alimentar de 4h (n = 6 – 8 animais por grupo) (A), ingestão alimentar de 24h (n = 7 – 8 animais por grupo) (B), ingestão de alimento palatável (apenas machos, n = 8 por grupo) (C) e ingestão alimentar por fases do ciclo circadiano (n = 7 – 9 animais por grupo) (D). Resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$. (*) Efeito do desmame precoce, (#) efeito do sexo. A, B, two-way ANOVA com pós-teste de tukey; C, T-test; D, three-way ANOVA com pós-teste de tukey. (□) desmame regular, (■) desmame precoce.

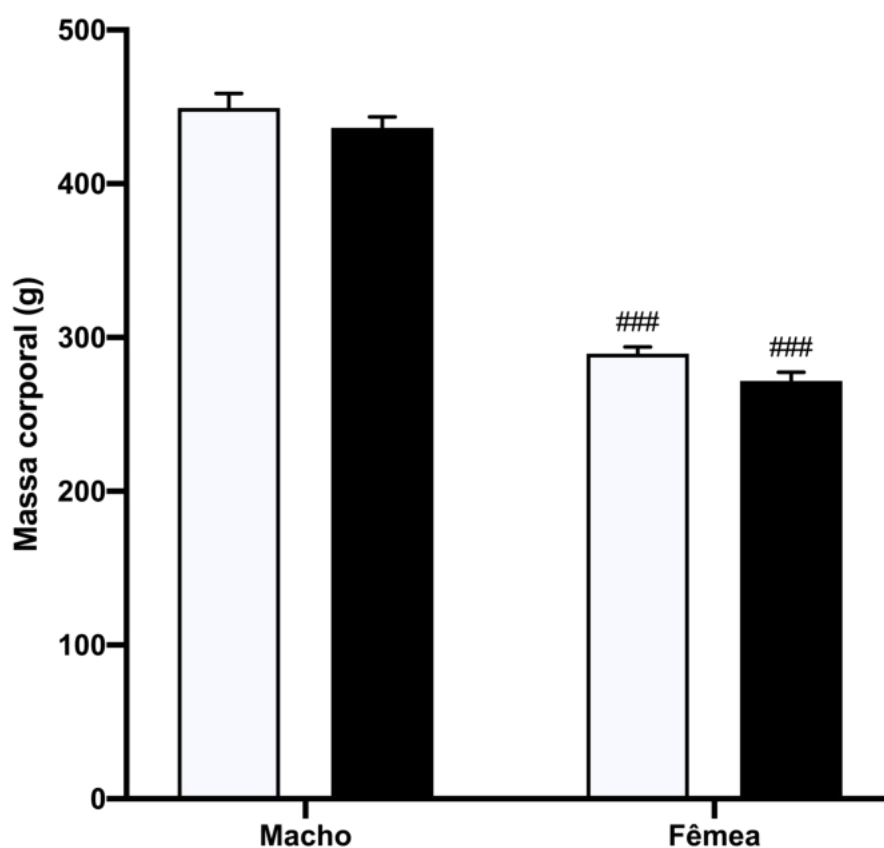


Fonte: Tavares (2021)

6.1.2 Efeitos do desmame precoce sobre a massa corporal de ratos machos e fêmeas adultos

Não foi observada interação significativa entre os fatores sexo e desmame precoce no ANOVA *two-way* para a massa corporal [$F(1,33) = 0,09200$, $p=0,7636$], apenas efeito isolado de ambos os fatores, sexo [$F(1,33) = 487,7$, $p<0,0001$] e desmame precoce [$F(1,33) = 4,361$, $p=0,0446$]. O pós-teste de *tukey* demonstrou redução de massa corporal em FC ($p<0,0001$) e FDP ($p<0,0001$), quando comparadas a MC e MDP, respectivamente (Fig. 4).

Figura 4 – Efeitos do desmame precoce sobre a massa corporal de ratos adultos de ambos os sexos. Ratos de ambos os sexos foram desmamados regularmente (PND30) ou precocemente (PND15), e entre 230 – 250 dias tiveram sua massa corporal mensurada ($n = 7 - 11$ por grupo). Resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, $###p<0,001$. (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de *tukey*, (□) desmame regular, (■) desmame precoce.

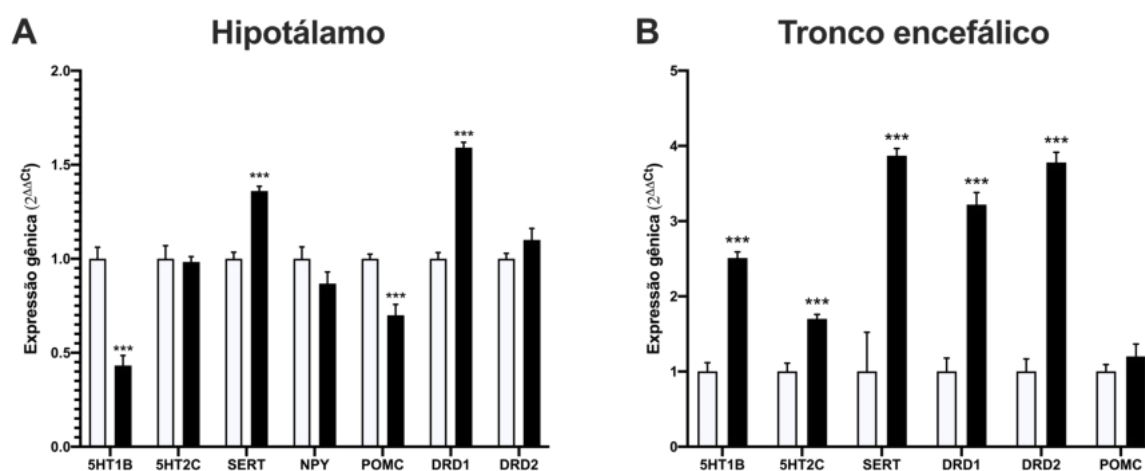


Fonte: Tavares (2021)

6.1.3 Efeitos do desmame precoce sobre a expressão de genes relacionados à ingestão de alimentos no hipotálamo e tronco encefálico de ratos machos adultos

No hipotálamo, o teste t de *student* demonstrou que o desmame precoce promoveu aumento da expressão gênica de SERT ($p=0,000158$) e DRD1 ($p<0,0001$), porém diminuição na expressão de 5HT1B ($p<0,0001$) e POMC ($p=0,000697$) (Fig. 5A). Por outro lado, no tronco encefálico, o teste t de *student* demonstrou que o desmame precoce provocou aumento na expressão gênica de 5HT1B ($p<0,0001$), 5HT2C ($p=0,001398$), SERT ($p=0,001389$), DRD1 ($p<0,0001$) e DRD2 ($p<0,0001$) (Fig. 5B).

Figura 5 – Efeitos do desmame precoce sobre a expressão de genes relacionados ao comportamento alimentar no hipotálamo e tronco encefálico de ratos machos adultos. Ratos de ambos os sexos foram desmamados regularmente (PND30) ou precocemente (PND15), e entre 230 – 250 dias de vida foram eutanasiados através de decapitação quando amostras do hipotálamo (A) e tronco encefálico (B) foram coletadas e processadas para o RT-PCR ($n = 3 - 6$ por grupo). Resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, *** $p<0,001$. A, B, student T-test, (□) desmame regular, (■) desmame precoce.



Fonte: Tavares (2021)

6.1.4 Efeitos do desmame precoce sobre parâmetros metabólicos em ratos adultos machos e fêmeas

O teste ANOVA *two-way* não apresentou interação entre os fatores sexo e desmame precoce no que diz respeito à massa do fígado [$F(1, 34) = 0,1829$,

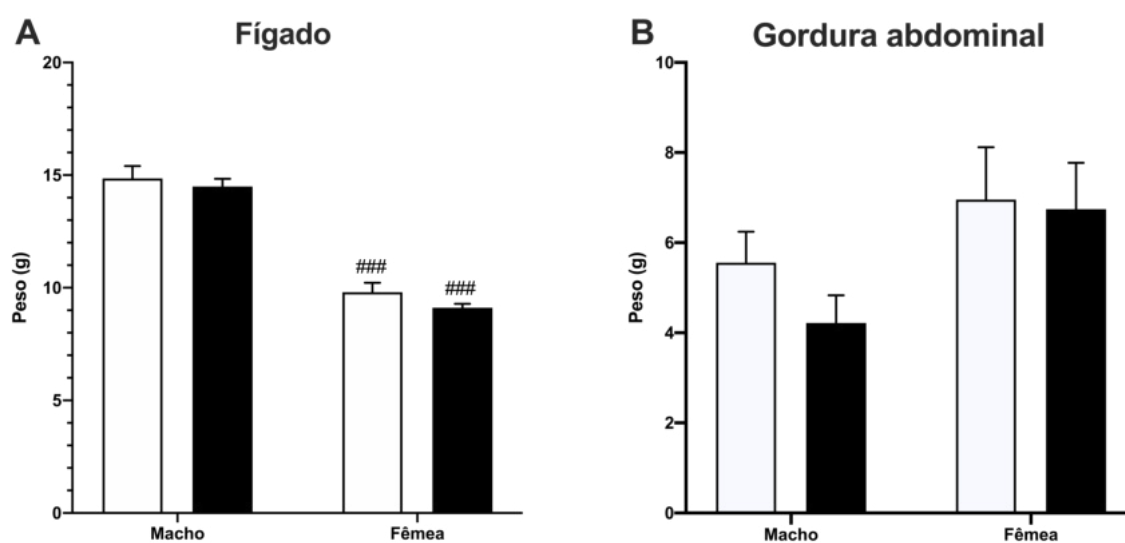
$p=0,6716$]. O pós-teste de *tukey* revelou menor massa do fígado em FC ($p<0,0001$) e FDP ($p<0,0001$), quando comparadas a MC e MDP, respectivamente (Fig. 6A).

No que diz respeito à massa de gordura abdominal, ANOVA *two-way* não apresentou interação entre os dois fatores (sexo vs desmame precoce) [$F(1, 34) = 0,4006$, $p=0,5310$], e não houveram diferenças entre os grupos (Fig. 6B).

Segundo o teste ANOVA *two-way*, foi observada interação significativa entre os fatores sexo e desmame precoce para os níveis séricos de triglicerídeos [$F(1, 21) = 8,698$, $p=0,0077$]. O pós-teste de *tukey* revelou diminuição nos níveis séricos de triglicerídeos em MDP ($p=0,0373$), em comparação a MC, e maior trigliceridemia em FDP, em comparação à MDP ($p<0,0001$) (Fig. 7A).

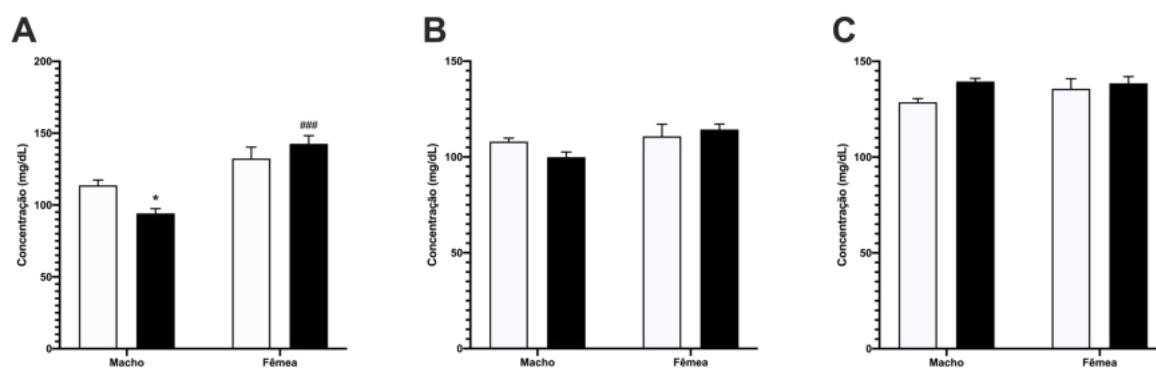
Quanto à colesterolemia (Fig. 7B) e glicemia (Fig. 7C), ANOVA *two-way* não apresentou interação entre os fatores sexo e desmame precoce, [$F(1,23) = 2,628$, $p=0,1186$] e [$F(1, 21) = 1,520$, $p=0,2312$], respectivamente. Além disso, o pós-teste de *tukey* não apresentou diferenças entre os grupos.

Figura 6 – Efeitos do desmame precoce sobre a massa do fígado e da gordura abdominal de ratos adultos de ambos os sexos. Ratos de ambos os sexos foram desmamados regularmente (PND30) ou precocemente (PND15), e entre 230 – 250 dias de vida foram eutanasiados, quando foram coletados o fígado (A) e a gordura abdominal (B), que foram pesados ($n = 6 - 11$ por grupo). Resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, $###p<0,01$. (#) efeito do sexo. A, B, two-way ANOVA com pós-teste de *tukey*. (□) desmame regular, (■) desmame precoce.



Fonte: Tavares (2021)

Figura 7 – Efeitos do desmame precoce sobre parâmetros metabólicos de ratos adultos de ambos os sexos. Ratos de ambos os sexos foram desmamados regularmente (PND30) ou precocemente (PND15), e entre 230 – 250 dias de vida foram eutanasiados, quando o sangue do tronco foi coletado e processado para análises de níveis séricos de triglicerídeos (A), colesterol total (B) e glicemia (C) (n = 6 – 11 por grupo). Resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, * $p < 0,05$, ### $p < 0,001$. (*) Efeito do desmame precoce, (#) efeito do sexo. A, B, C two-way ANOVA com pós-teste de tukey; (□) desmame regular, (■) desmame precoce.



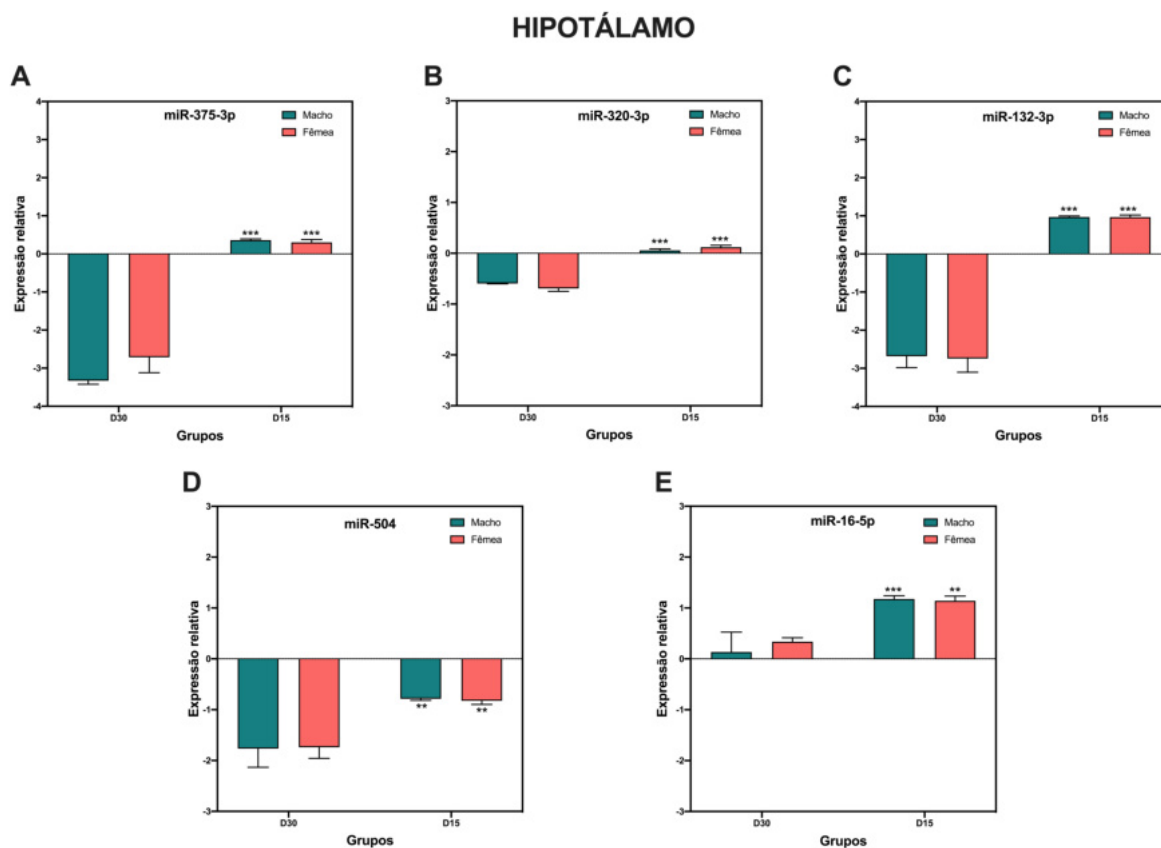
Fonte: Tavares (2021)

6.2 EXPERIMENTO II – EFEITOS MOLECULARES DO DESMAME PRECOCE E SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MIR-320-3P E MIR-375-3P SOBRE O CÉREBRO DE RATOS

6.2.1 Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de microRNAs e mRNAs associados com o controle central do comportamento alimentar

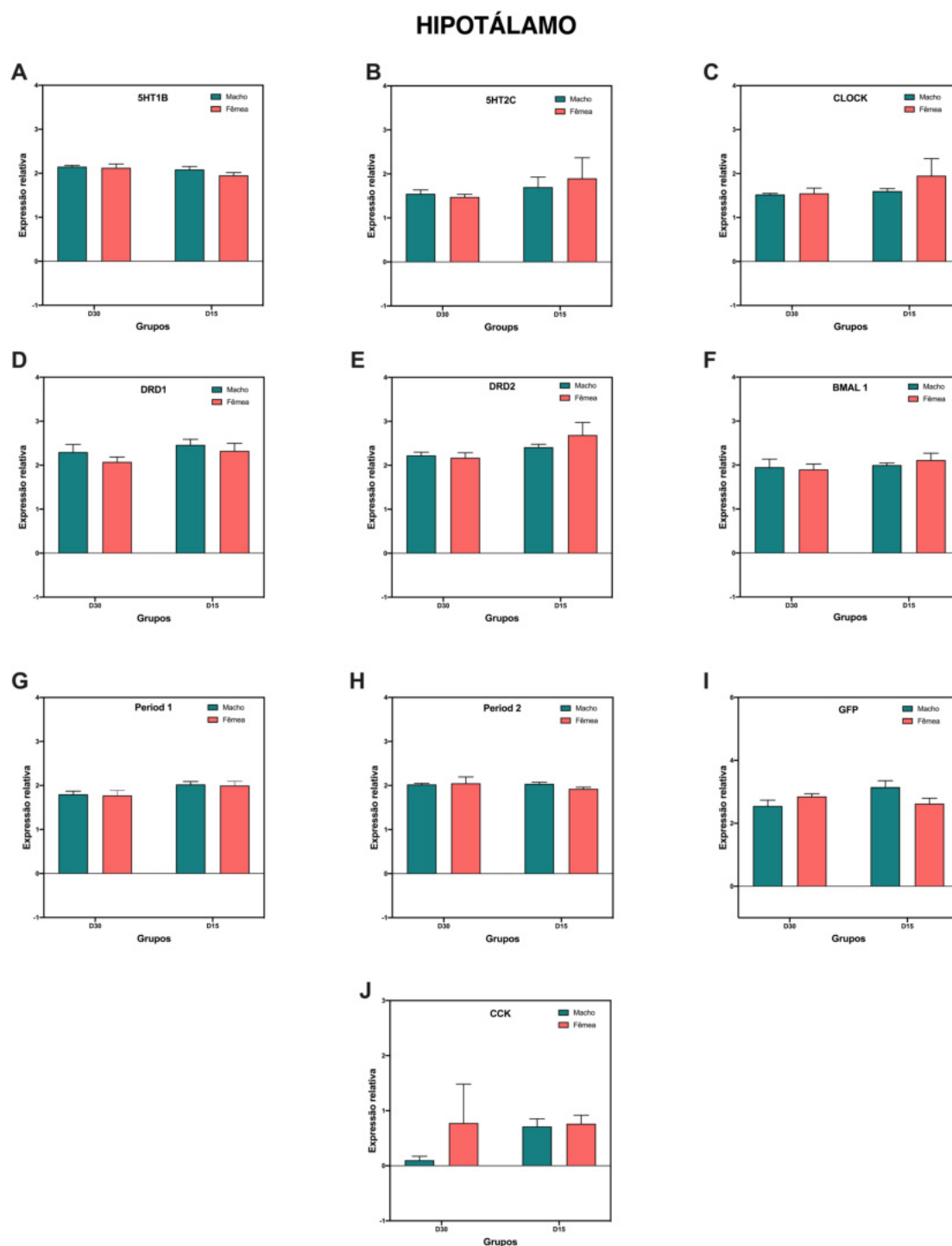
No hipotálamo, o desmame precoce promoveu aumento na expressão de miR-375-3p em machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,001$) (Fig. 8A); aumento na expressão de miR-320-3p em machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,001$) (Fig. 8B); aumento na expressão de miR-132-3p em machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,001$) (Fig. 8C); aumento na expressão de miR-16-5p em machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,01$) (Fig. 8E); diminuição na expressão de miR-504 em machos ($p < 0,01$) e fêmeas ($p < 0,01$) (Fig. 8D). Nenhuma diferença de sexo foi observada no que diz respeito aos microRNAs. Quanto aos mRNAs, nenhuma diferença entre os grupos foi observada, nem em resposta ao desmame precoce nem em relação ao sexo (Fig. 9).

Figura 8 – Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de microRNAs no hipotálamo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos ao desmame regular (D30) (n = 4) ou desmame precoce (D15) (n = 8), e aos 45 dias de idade foram eutanasiados e amostras do hipotálamo foram coletadas. A expressão de miR-375-3p (A), miR-320-3p (B), miR-132-3p (C), miR-504 (D) e miR-16-5p (E) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, **p<0,01, ***p<0,001. (*) Efeito do desmame precoce. A, B, C, D, E two-way ANOVA com pós-teste de tukey.



Fonte: Tavares (2021)

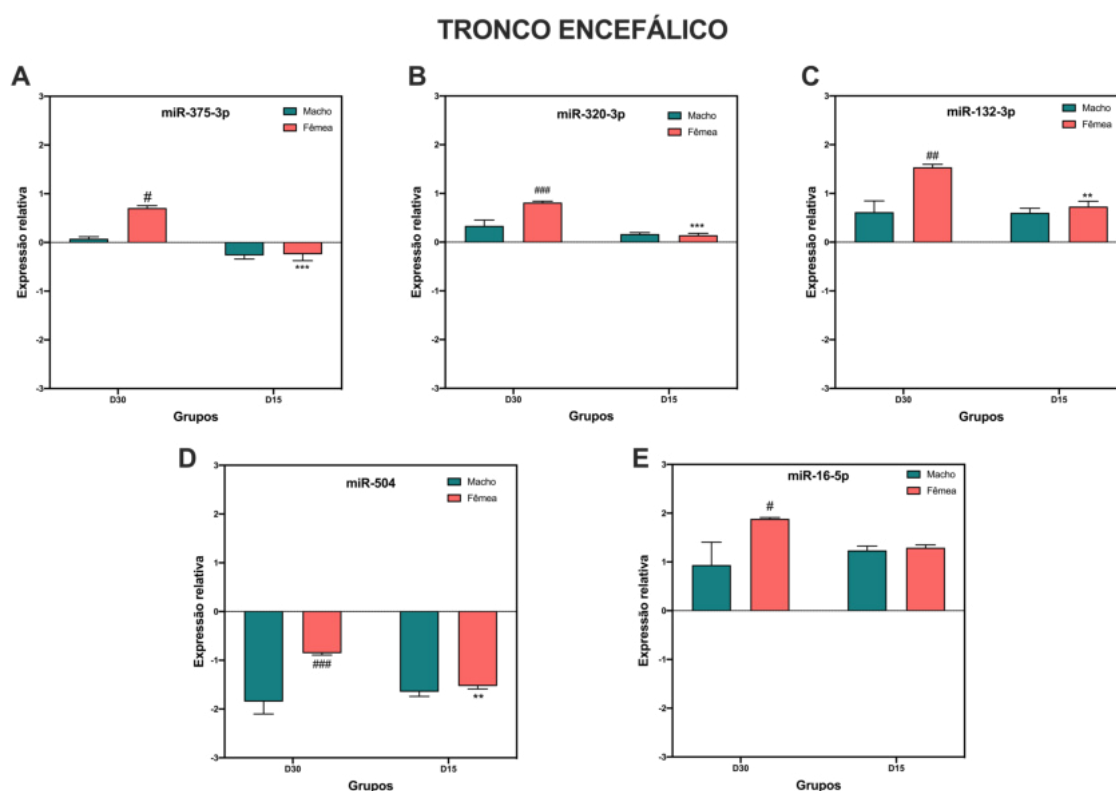
Figura 9 – Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de mRNAs no hipotálamo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos ao desmame regular (D30) (n = 4) ou desmame precoce (D15) (n = 8), e aos 45 dias de idade foram eutanasiados e amostras do hipotálamo foram coletadas. A expressão de 5HT1B (A), 5HT2C (B), CLOCK (C), DRD1 (D), DRD2 (E), BMAL1 (F), Period1 (G), Period2 (H), GFP (I) e CCK (J) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para as análises.



Fonte: Tavares (2021)

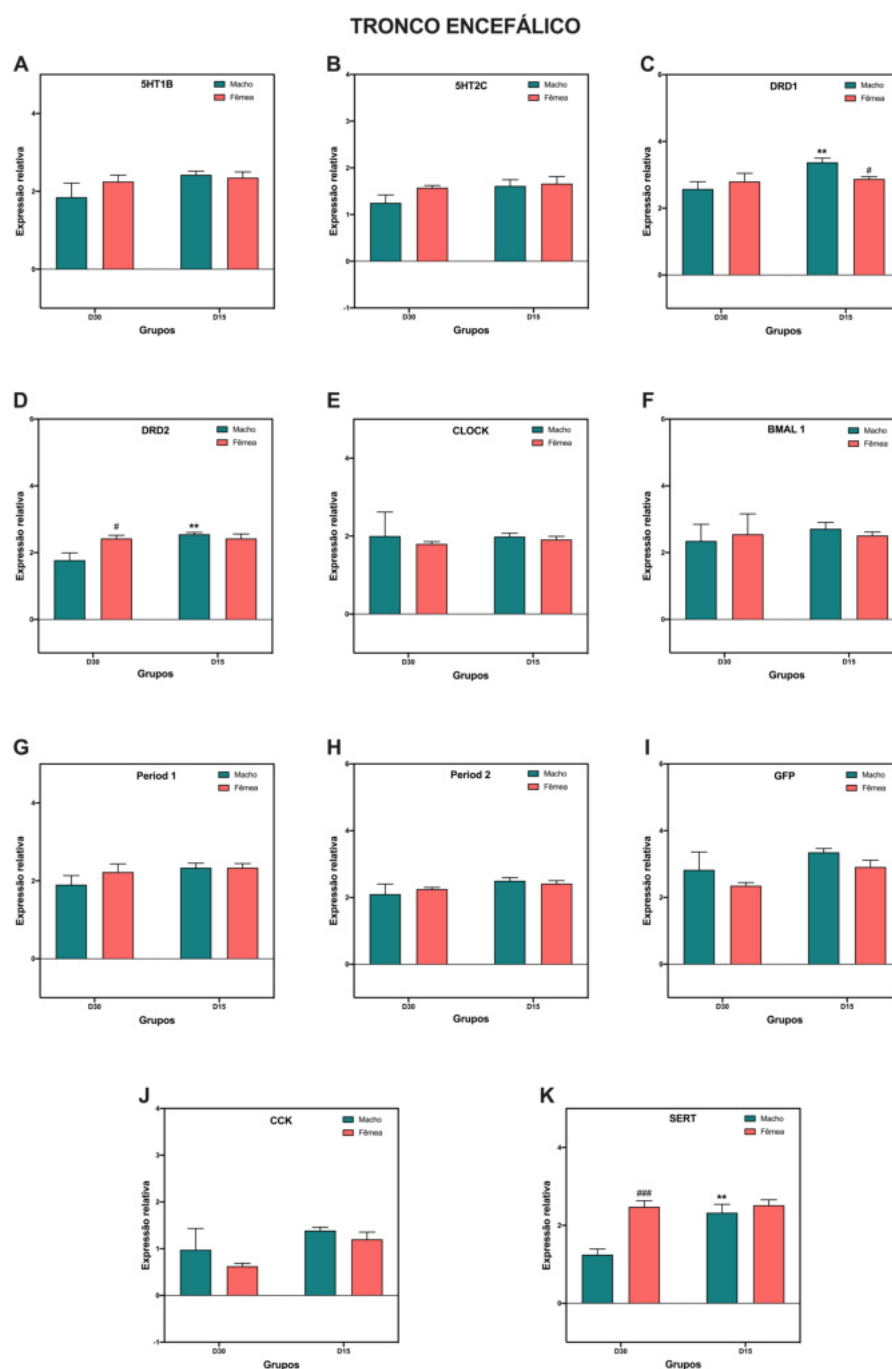
No tronco encefálico de fêmeas, o desmame precoce promoveu diminuição na expressão de miR-375-3p ($p<0,001$) (Fig. 10A), miR-320-3p ($p<0,001$) (Fig. 10B), miR-132-3p ($p<0,01$) (Fig. 10C) e miR-504 ($p<0,01$). Por outro lado, a expressão de miR-375-3p ($p<0,05$) (Fig. 10A), miR-320-3p ($p<0,001$) (Fig. 10B), miR-132-3p ($p<0,001$) (Fig. 10C), miR-504 ($p<0,001$) (Fig. 10D) e miR-16-5p ($p<0,05$) (Fig. 10E) foi aumentada em fêmeas controle, quando comparadas aos machos controle, diferença de sexo esta que não foi observada no grupo de animais desmamados precocemente. No que diz respeito aos mRNAs no tronco encefálico, o desmame precoce resultou em aumento da expressão de DRD1 ($p<0,01$) (Fig. 11C), DRD2 ($p<0,01$) (Fig. 11D) e SERT ($p<0,01$) (Fig. 11K) apenas em machos. Além disso, a expressão de DRD1 foi diminuída em fêmeas desmamadas precocemente, quando comparadas aos machos do mesmo grupo ($p<0,05$) (Fig. 11C), diferença esta não observada no grupo controle. No grupo controle, tanto a expressão de DRD2 ($p<0,05$) (Fig. 11D) como a de SERT ($p<0,001$) (Fig. 11K) foi aumentada nas fêmeas, quando comparadas aos machos. Esta mesma diferença de sexo não foi observada no grupo desmame precoce.

Figura 10 – Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de microRNAs no tronco encefálico. Ratos de ambos os sexos foram submetidos ao desmame regular (D30) (n = 4) ou desmame precoce (D15) (n = 8), e aos 45 dias de idade foram eutanasiados e amostras do tronco encefálico foram coletadas. A expressão de miR-375-3p (A), miR-320-3p (B), miR-132-3p (C), miR-504 (D) e miR-16-5p (E) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, **p<0,01, ***p<0,001, #p<0,05, ###p<0,01, ####p<0,001. (*) Efeito do desmame precoce, (#) efeito do sexo. A, B, C, D, E two-way ANOVA com pós-teste de tukey.



Fonte: Tavares (2021)

Figura 11 – Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de mRNAs no tronco encefálico. Ratos de ambos os sexos foram submetidos ao desmame regular (D30) (n = 4) ou desmame precoce (D15) (n = 8), e aos 45 dias de idade foram eutanasiados e amostras do tronco encefálico foram coletadas. A expressão de 5HT1B (A), 5HT2C (B), DRD1 (C), DRD2 (D), CLOCK (E), BMAL1 (F), Period1 (G), Period2 (H), GFP (I), CCK (J) e SERT (K) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. **p<0,001, ###p<0,001, (*) efeito do desmame precoce, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para as análises.

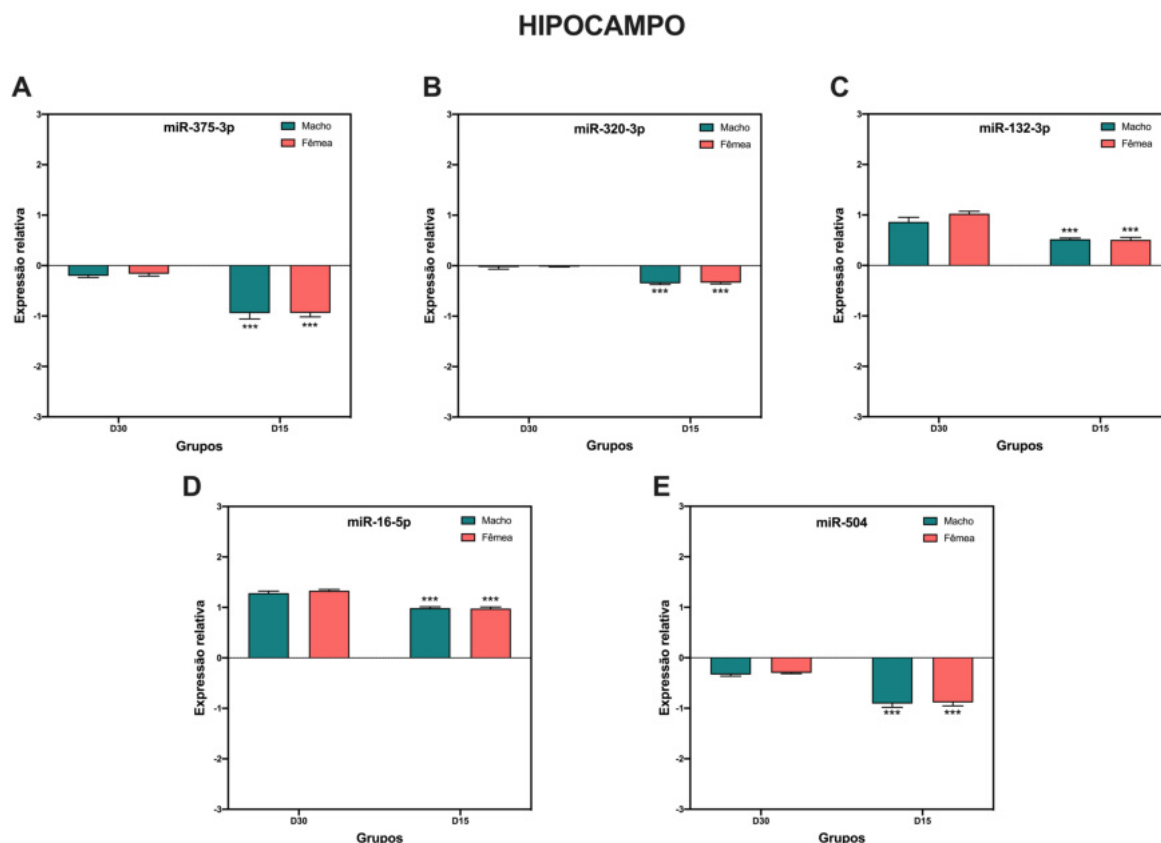


Fonte: Tavares (2021)

Na terceira região avaliada, o hipocampo, a expressão de miR-375-3p ($p<0,001$) (Fig. 12A), miR-320-3p ($p<0,001$) (Fig. 12B), miR-132-3p ($p<0,01$) (Fig. 12C), miR-504 ($p<0,01$) (Fig. 12D) e miR-16-5p (Fig. 12E) foi diminuída em machos e fêmeas desmamados precocemente, quando comparados aos machos e fêmeas controle. No que diz respeito aos mRNAs no hipocampo, o desmame precoce aumentou a expressão do receptor 5HT1B ($p<0,05$) (Fig. 13A) e de CLOCK ($p<0,05$) (Fig. 13E) em fêmeas, quando comparado às fêmeas controle. A respeito de CCK, a sua expressão foi aumentada em fêmeas controle ($p<0,01$) e fêmeas desmamadas ($p<0,001$), quando comparadas aos machos do mesmo grupo (Fig. 13J).

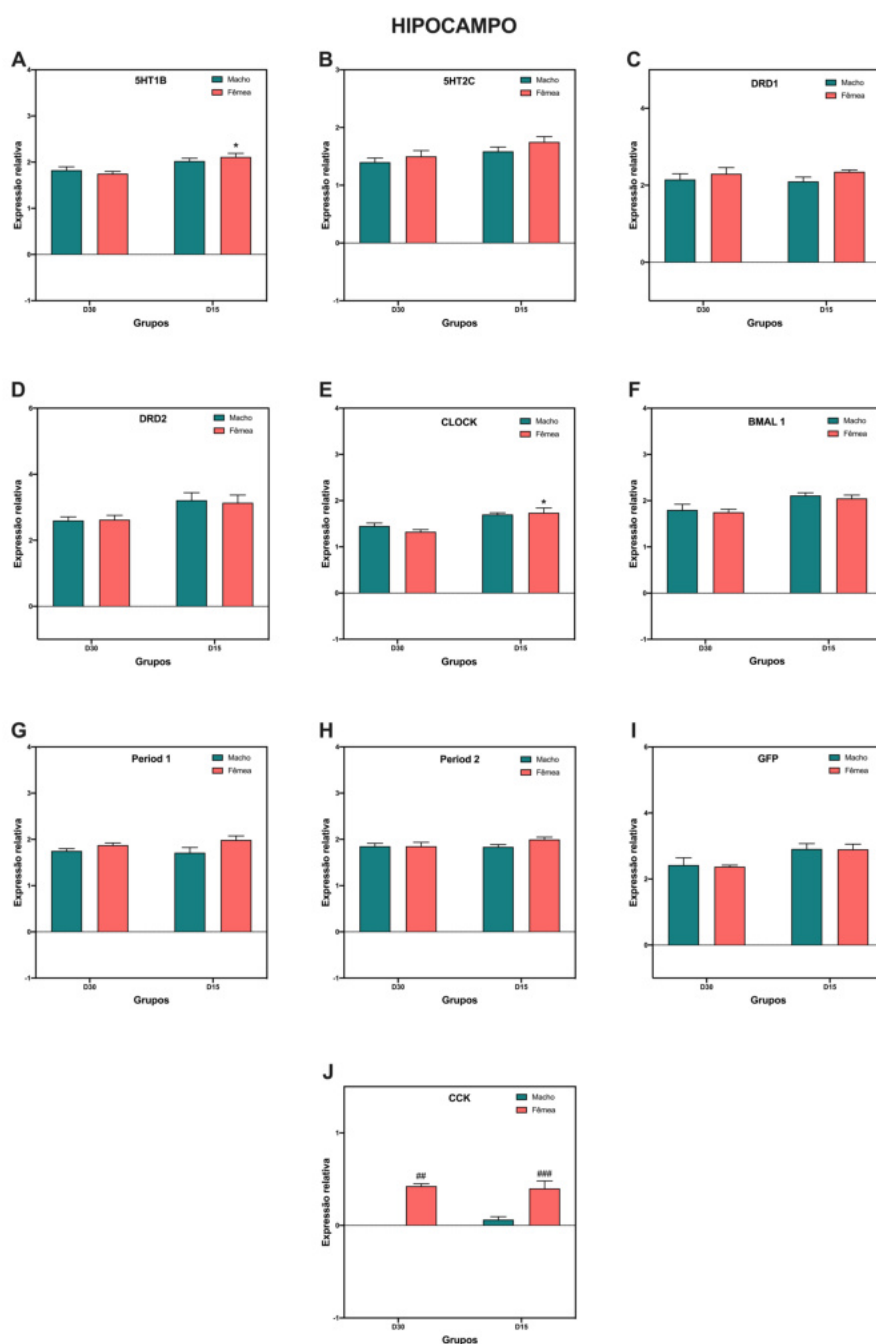
Figura 12 – Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de microRNAs no hipocampo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos ao desmame regular (D30) ($n = 4$) ou desmame precoce (D15) ($n = 8$), e aos 45 dias de idade foram eutanasiados e amostras do hipocampo foram coletadas.

A expressão de miR-375-3p (A), miR-320-3p (B), miR-132-3p (C), miR-504 (D) e miR-16-5p (E) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, *** $p<0,001$. (*) Efeito do desmame precoce. A, B, C, D, E two-way ANOVA com pós-teste de tukey.



Fonte: Tavares (2021)

Figura 13 – Efeitos do desmame precoce sobre a expressão gênica de mRNAs no hipocampo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos ao desmame regular (D30) (n = 4) ou desmame precoce (D15) (n = 8), e aos 45 dias de idade foram eutanasiados e amostras do hipocampo foram coletadas. A expressão de 5HT1B (A), 5HT2C (B), DRD1 (C), DRD2 (D), CLOCK (E), BMAL1 (F), Period1 (G), Period2 (H), GFP (I) e CCK (J) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,01$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, (*) efeito do desmame precoce, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para as análises.

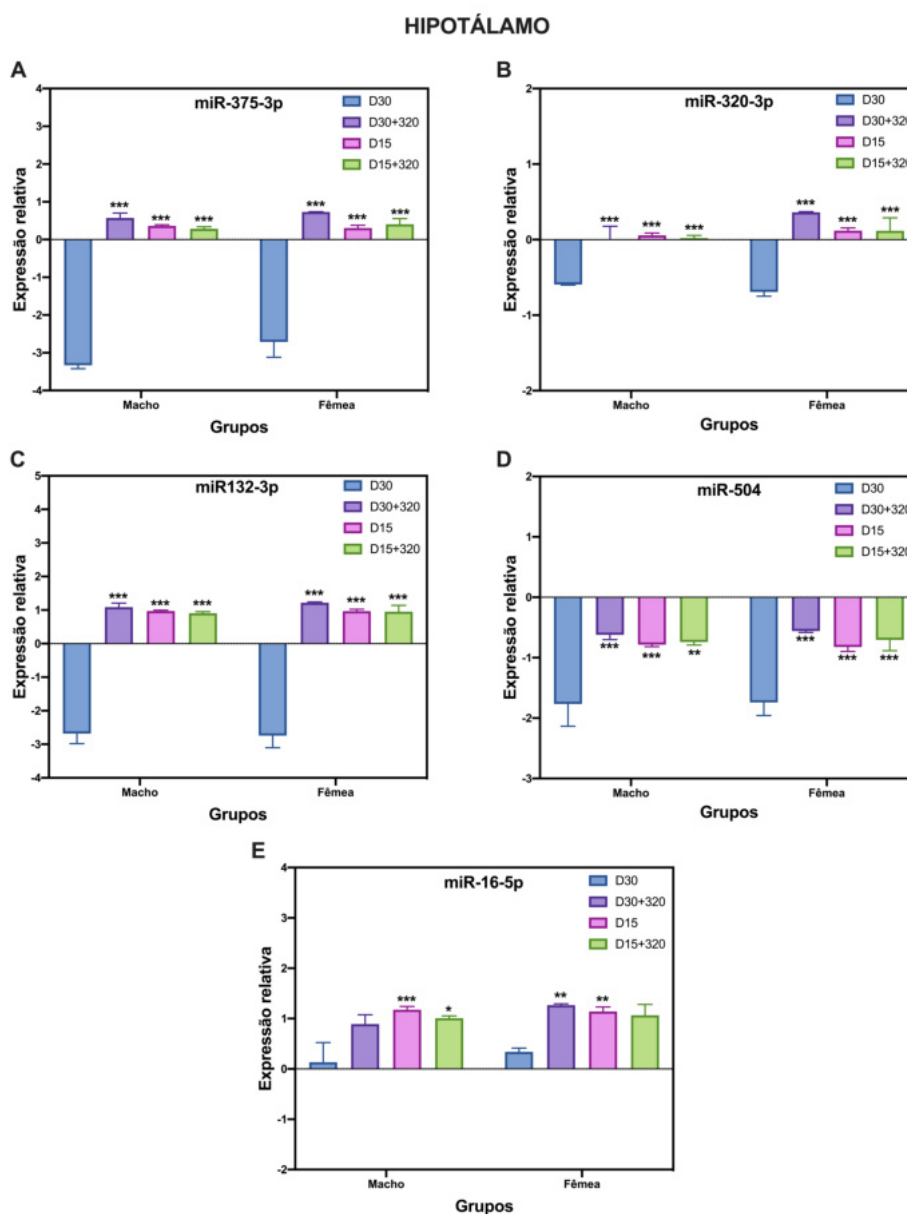


Fonte: Tavares (2021)

6.2.2 Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de microRNAs e mRNAs associados com o controle central do comportamento alimentar

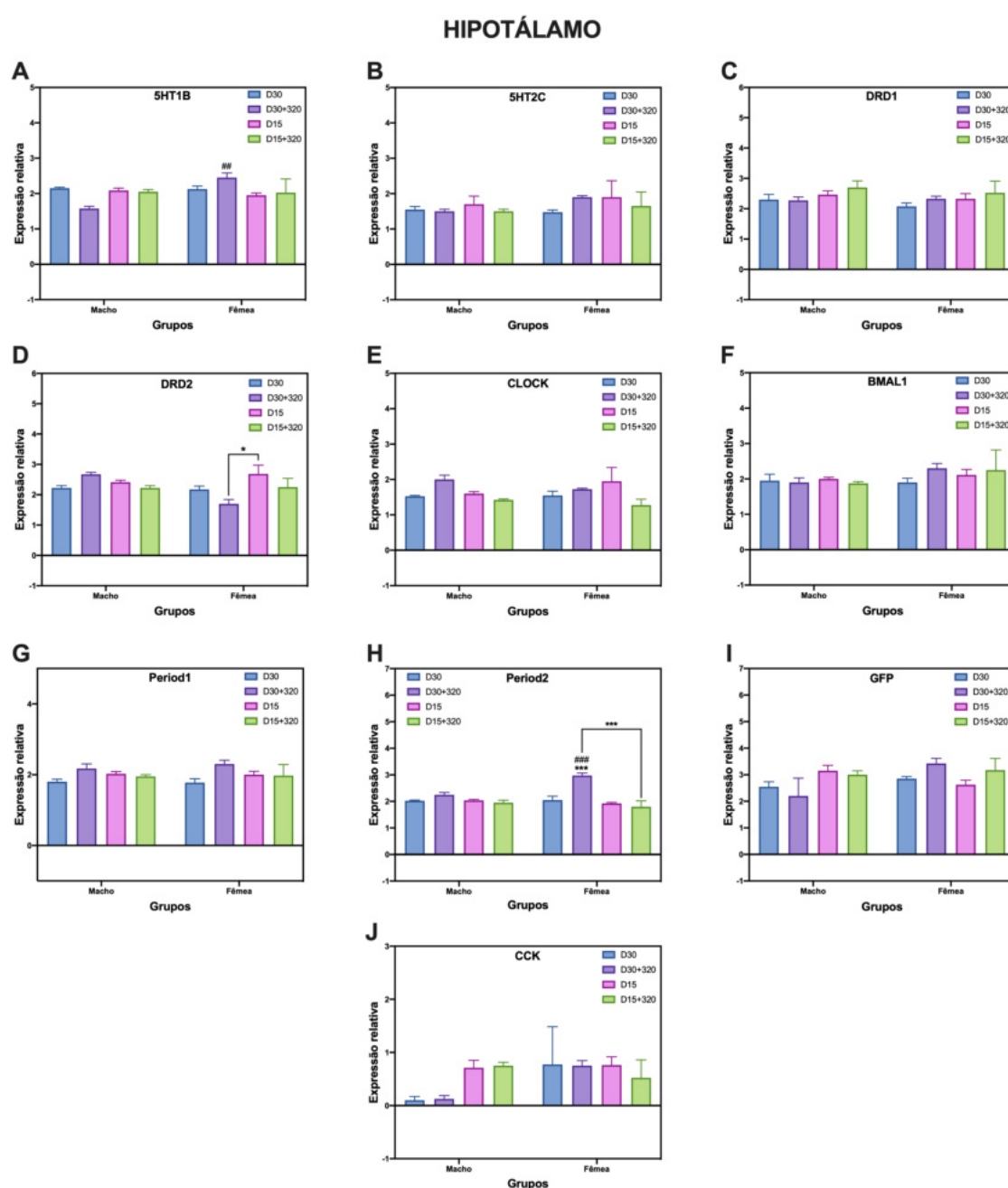
No hipotálamo, a expressão de miR-375-3p (Fig. 14A), miR-320-3p (Fig. 14B), miR-132-3p (Fig. 14C) e miR-504 (Fig. 14D) apresentou-se aumentada em MC320 ($p<0,001$), MD ($p<0,001$) e MD320 ($p<0,001$), quando comparados à MC, e em FC320 ($p<0,001$), FD ($p<0,001$) e FD320 ($p<0,001$), quando comparadas à FC. Além disso, a expressão de miR-16-5p (Fig. 14E) foi aumentada em MD ($p<0,001$) e MD320 ($p<0,05$), quando comparada à MC, e aumentada em FC320 ($p<0,01$) e FD ($p<0,01$), quando comparadas à FC. Além disso, a respeito da expressão dos mRNAs no hipotálamo, a expressão de 5HT1B (Fig. 15A) foi aumentada em FC320 ($p<0,01$), em comparação a MC320. A expressão de Per2 (Fig. 15H) foi aumentada em FC320 ($p<0,001$), em comparação a FC, FD320 e MC320.

Figura 14 – Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de microRNAs no hipotálamo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-320-3p ou veículo (DOSP) no dia 12 de vida, além de terem sido desmamados na idade regular (D30) ou precoce (D15) ($n = 4 - 8$ por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o hipotálamo foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de miR-375-3p (A), miR-320-3p (B), miR-132-3p (C), miR-504 (D) e miR-16-5p (E) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, $*p < 0,05$, $**p < 0,001$, $***p < 0,001$. (*) Efeito do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



Fonte: Tavares (2021)

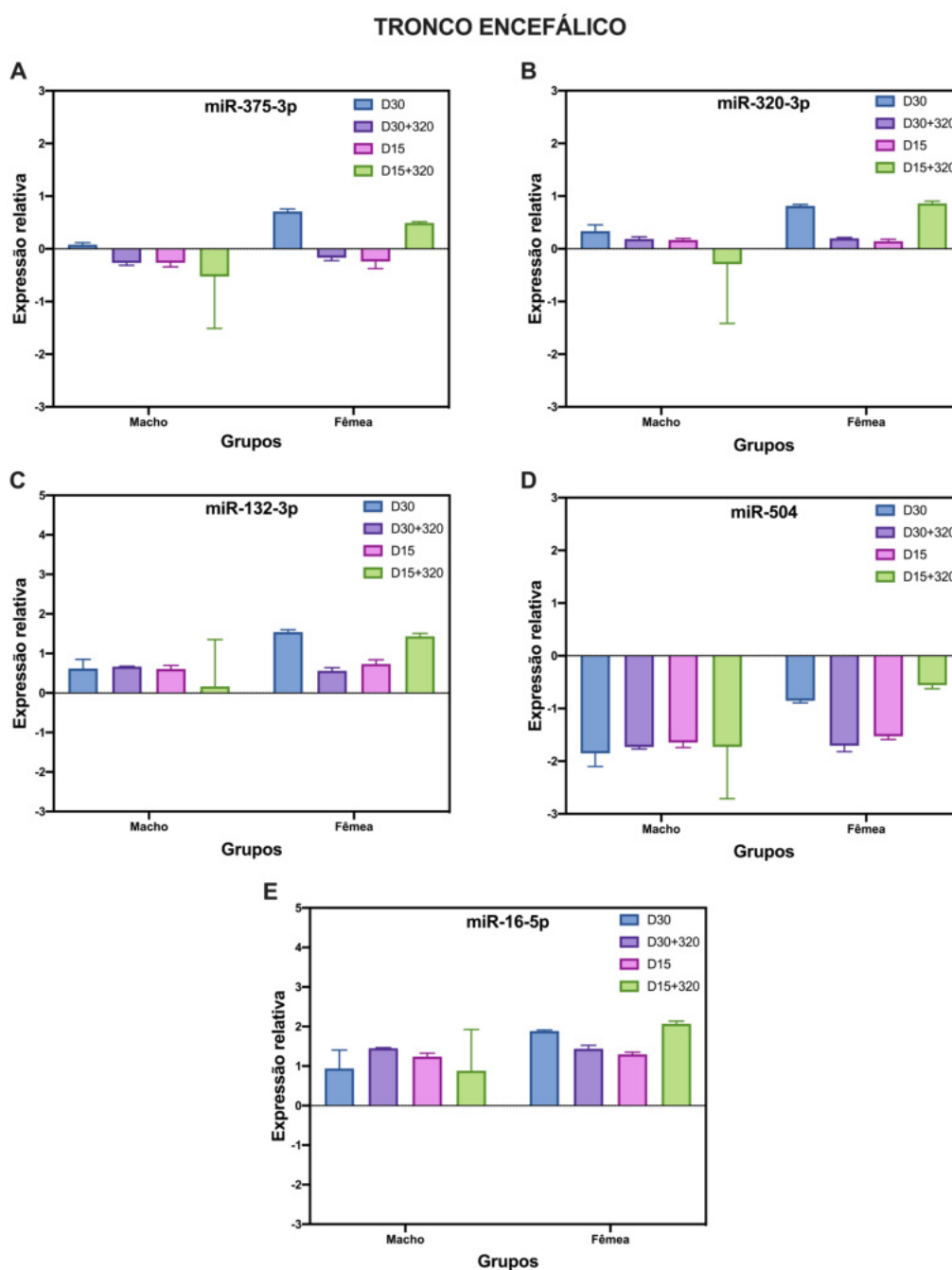
Figura 15 – Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de mRNAs no hipotálamo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-320-3p ou veículo (DOSP) no dia 12 de vida, além de terem sido desmamados na idade regular (D30) ou precoce (D15) (n = 4 – 8 por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o hipotálamo foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de 5HT1B (A), 5HT2C (B), DRD1 (C), DRD2 (D), CLOCK (E), BMAL1 (F), Period1 (G), Period2 (H), GFP (I) e CCK (J) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, ***p<0,001, ###p<0,001. (*) Efeito do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



Fonte: Tavares (2021)

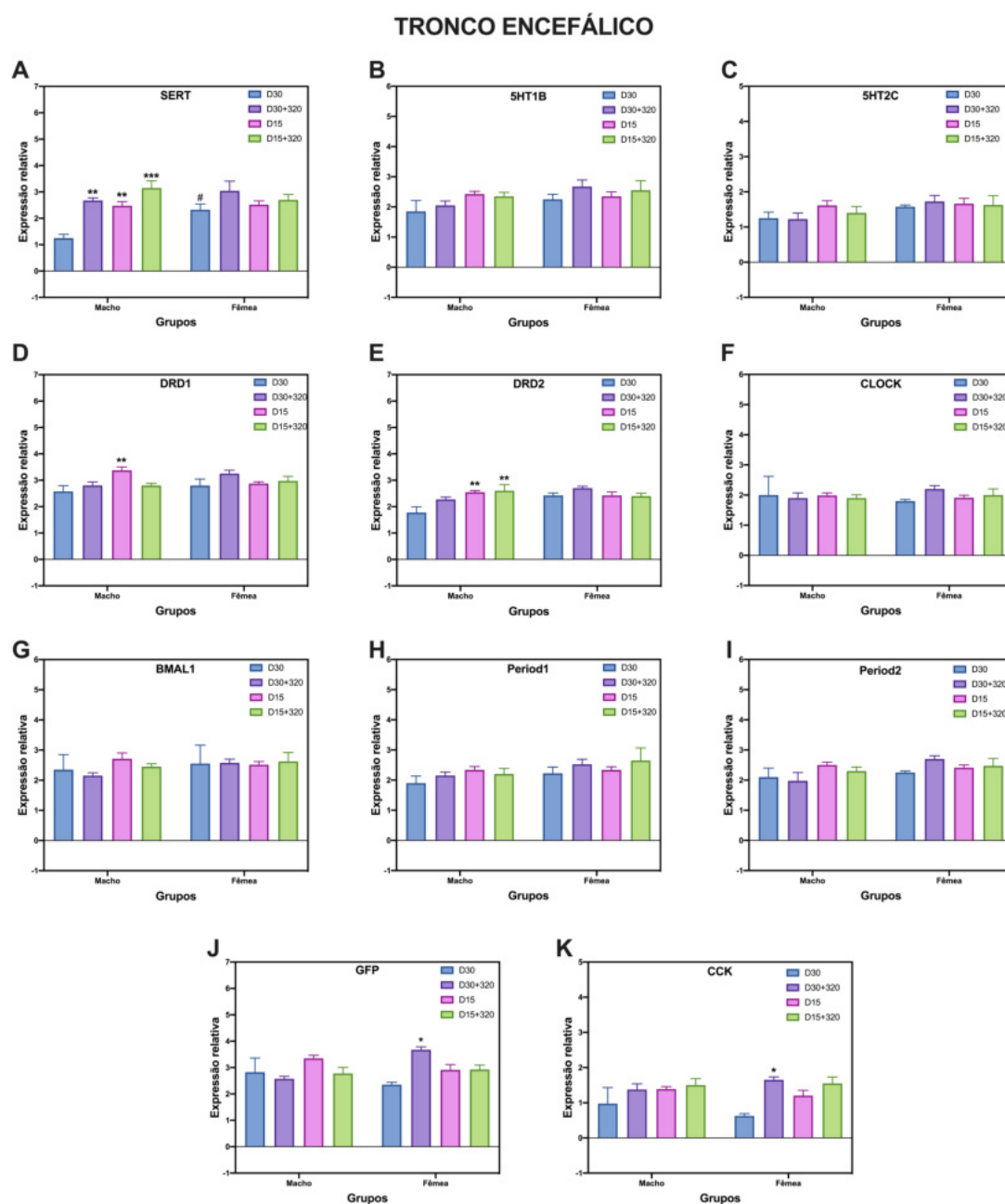
No tronco encefálico, não foram observados efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de nenhum dos microRNAs mensurados (Fig. 16). Por outro lado, a respeito da expressão dos mRNAs nesta mesma região, foi observado que a expressão de SERT (Fig. 17A) foi aumentada em MC320 ($p<0,01$), MD ($p<0,01$) e MD320 ($p<0,001$), quando comparados a MC. Além disso, a expressão de SERT foi maior em FC ($p<0,05$), comparado a MC (Fig. 17A). Além disso, a expressão de DRD2 (Fig. 17E) foi aumentada em MD ($p<0,01$) e MD320 ($p<0,01$), em comparação a MC. A expressão de GFP (Fig. 17J) e CCK (Fig. 17K) também foi aumentada em FC320 ($p<0,05$), quando comparado a FC.

Figura 16 – Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de microRNAs no tronco encefálico. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-320-3p ou veículo (DOSP) no dia 12 de vida, além de terem sido desmamados na idade regular (D30) ou precoce (D15) ($n = 4 - 8$ por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o tronco encefálico foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de miR-375-3p (A), miR-320-3p (B), miR-132-3p (C), miR-504 (D) e miR-16-5p (E) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



Fonte: Tavares (2021)

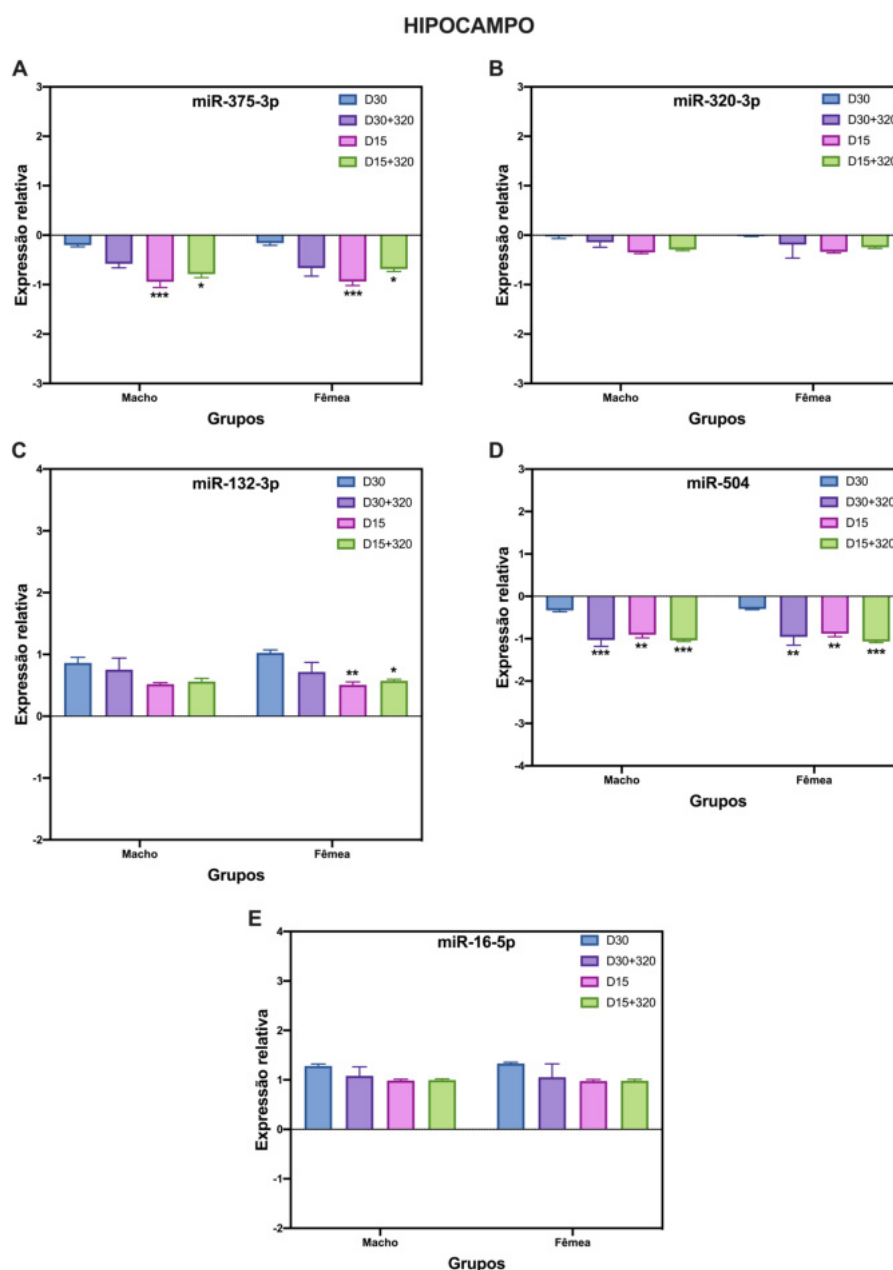
Figura 17 – Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de mRNAs no tronco encefálico. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-320-3p ou veículo (DOSP) no dia 12 de vida, além de terem sido desmamados na idade regular (D30) ou precoce (D15) (n = 4 – 8 por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o hipotálamo foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de SERT (A), 5HT1B (B), 5HT2C (C), DRD1 (D), DRD2 (E), CLOCK (F), BMAL1 (G), Period1 (H), Period2 (I), GFP (J) e CCK (K) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$. (*) Efeito do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



Fonte: Tavares (2021)

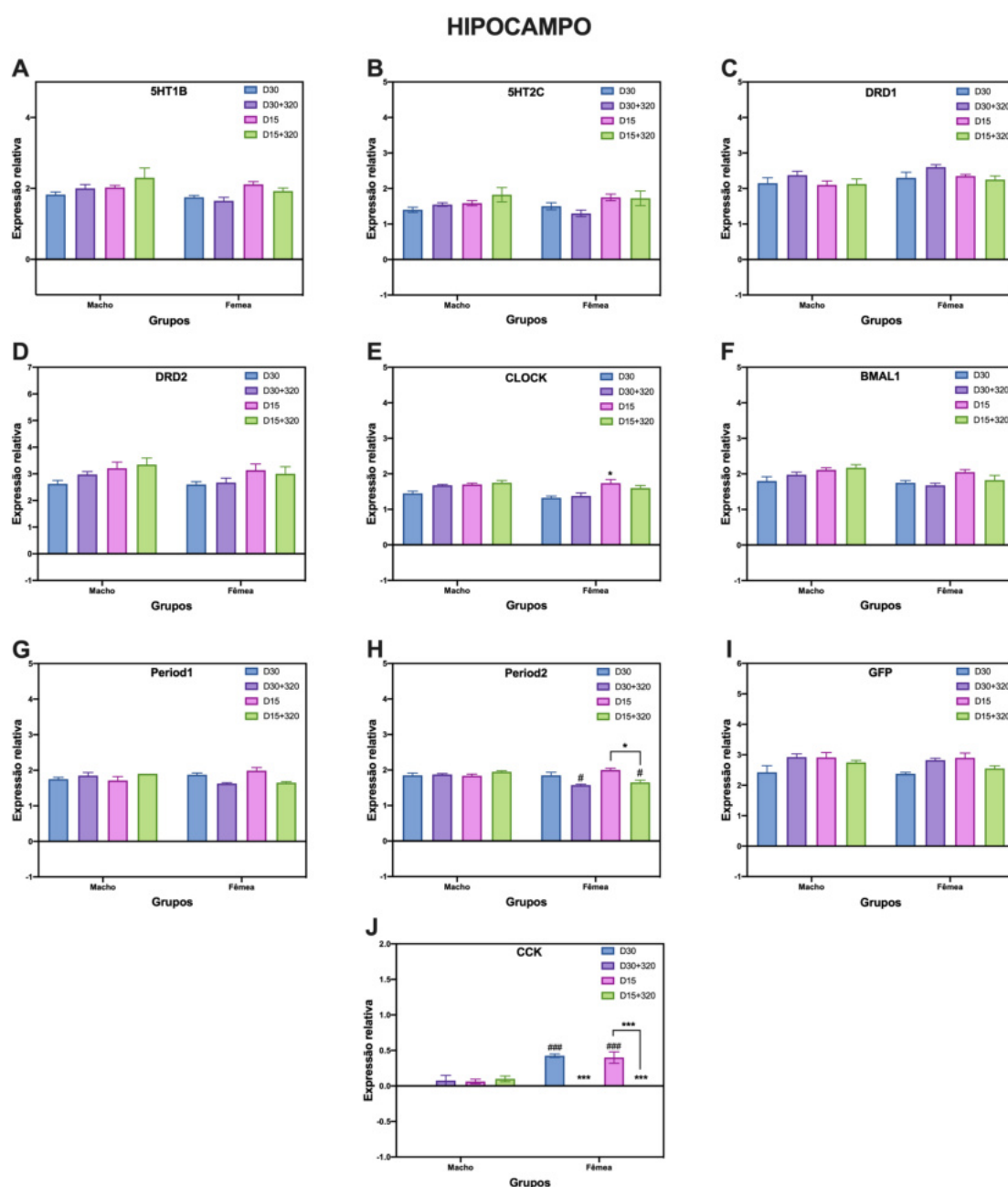
Por último, no hipocampo a expressão de miR-375-3p (Fig. 18A) foi menor em MD ($p<0,001$) e MD320 ($p<0,05$), em comparação a MC, e em FD ($p<0,001$) e FC320 ($p<0,05$), em comparação a FC. A expressão de miR-132-3p (Fig. 18C) foi menor em FD ($p<0,01$) e em FD320 ($p<0,05$), em comparação a FC. Já a expressão de miR-504 (Fig. 18D) foi diminuída em MC320 ($p<0,001$), MD ($p<0,01$) e MD320 ($p<0,001$), em comparação a MC, e em FC320 ($p<0,01$), FD ($p<0,01$) e FD320 ($p<0,001$), em comparação à FC. Sobre a expressão dos mRNAs nesta região, a expressão de CLOCK (Fig. 19E) apresentou-se aumentada em FD ($p<0,05$), em comparação à FC e FC320. Já a expressão de BMAL1 (Fig. 19F) foi maior em FD ($p<0,05$) apenas em comparação a FC320. A expressão de Per2 foi maior em FD ($p<0,05$), em comparação à FD320. A expressão de Per2 (Fig. 19H) também foi menor em FC320 ($p<0,05$) e FD320 ($p<0,05$), quando comparados a MC320 e MD320, respectivamente. Por sua vez, a expressão de CCK (Fig. 19J) foi diminuída em FC320 ($p<0,001$) e FD320 ($p<0,001$) em comparação à FC e diminuída em FD320 quando comparada à FD ($P<0,001$). Adicionalmente, maior expressão de CCK (Fig. 19J) foi observada em FC ($p<0,001$) e FD ($p<0,001$), em comparação a MC e MD, respectivamente.

Figura 18 – Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de microRNAs no hipocampo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-320-3p ou veículo (DOSP) no dia 12 de vida, além de terem sido desmamados na idade regular (D30) ou precoce (D15) (n = 4 – 8 por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o hipocampo foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de miR-375-3p (A), miR-320-3p (B), miR-132-3p (C), miR-504 (D) e miR-16-5p (E) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$. (*) Efeito do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



Fonte: Tavares (2021)

Figura 19 – Efeitos do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p sobre a expressão de mRNAs no hipocampo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-320-3p ou veículo (DOSP) no dia 12 de vida, além de terem sido desmamados na idade regular (D30) ou precoce (D15) (n = 4 – 8 por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o hipocampo foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de 5HT1B (A), 5HT2C (B), DRD1 (C), DRD2 (D), CLOCK (E), BMAL1 (F), Period1 (G), Period2 (H), GFP (I) e CCK (J) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$. (*) Efeito do desmame precoce + suplementação de miR-320-3p, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



6.2.3 Efeitos da suplementação de miR-375-3p sobre a expressão de microRNAs e mRNAs associados com o controle central do comportamento alimentar

No hipotálamo, a suplementação oral do miR-375-3p promoveu aumento da expressão do miR-320-3p em machos ($p<0,001$) e fêmeas ($p<0,001$) (Fig. 20B). No hipocampo, nenhum efeito da suplementação do miR-375-3p foi observado em todos os miRNAs avaliados (Fig. 20F-J). No tronco encefálico também não foi observado efeito da suplementação do miR-375-3p, porém, em fêmeas controle, a expressão de miR-375-3p ($p<0,05$) (Fig. 20K), miR-320-3p ($p<0,01$) (Fig. 20L) e miR-132-3p ($p<0,01$) (Fig. 20M) foi aumentada, quando comparadas aos machos controle.

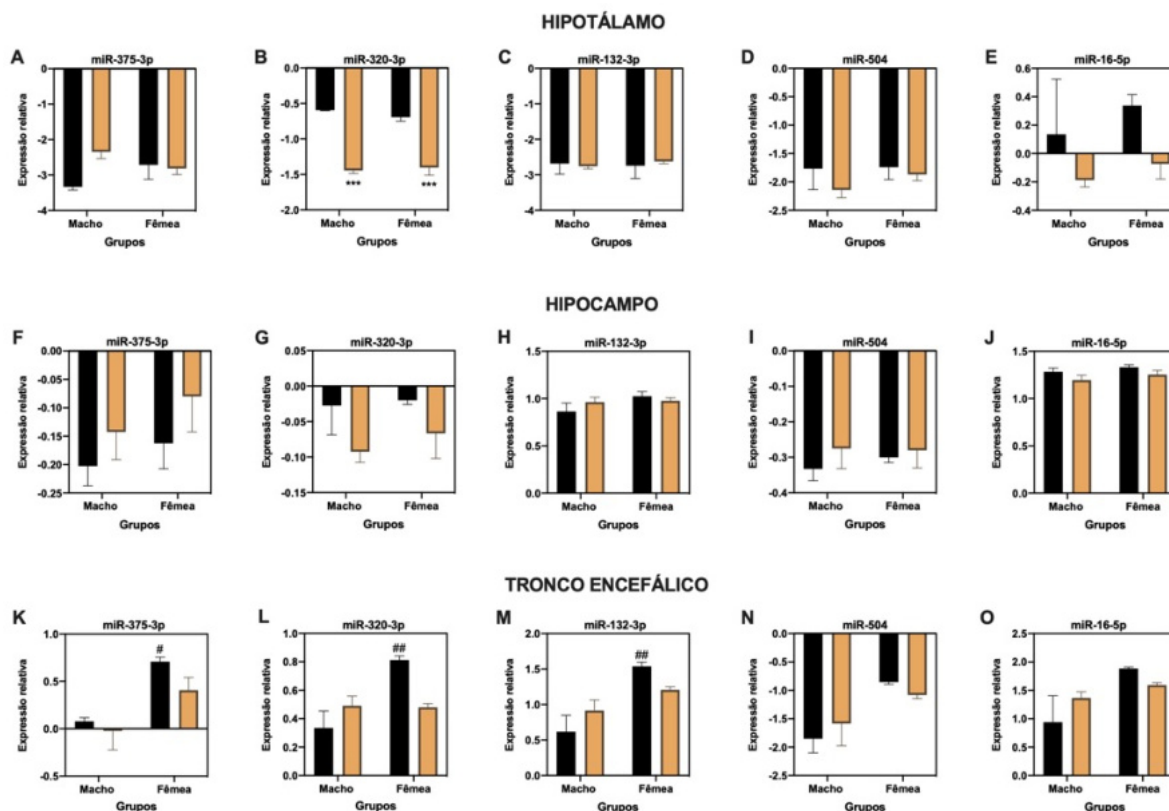
À respeito dos efeitos da suplementação de miR-375-3p sobre os mRNAs, no hipotálamo, a expressão de 5HT1B foi diminuída em machos ($p<0,001$) e fêmeas ($p<0,001$) suplementados (Fig. 21A), assim como a expressão de 5HT2C (machos, $p<0,001$; fêmeas, $p<0,001$) (Fig. 21B), DRD2 (machos, $p<0,001$; fêmeas, $p<0,01$) (Fig. 21D), CLOCK (machos, $p<0,01$; fêmeas, $p<0,001$) (Fig. 21E), BMAL (machos, $p<0,05$; fêmeas, $p<0,05$) (Fig. 21F), Period1 (machos, $p<0,01$; fêmeas, $p<0,01$) (Fig. 21G), Period2 (machos, $p<0,01$; fêmeas, $p<0,01$) (Fig. 21H) e GFP (machos, $p<0,05$; fêmeas, $p<0,05$) (Fig. 21I).

No hipocampo, a expressão de 5HT1B (Fig. 22A) e 5HT2C (Fig. 22B) foi reduzida em fêmeas suplementadas ($p<0,001$), além de estar reduzida em fêmeas suplementadas, quando comparadas aos machos suplementados ($p<0,01$). O mesmo resultado foi observado para o gene DRD1 (Fig. 22C), que foi diminuído em fêmeas suplementadas quando comparadas às fêmeas controle ($p<0,001$) e aos machos suplementados ($p<0,05$). O gene CLOCK (Fig. 22E) também foi diminuído em fêmeas suplementadas quando comparadas às fêmeas controle ($p<0,01$) e aos machos suplementados ($p<0,01$). A expressão de BMAL1 (Fig. 22F) foi diminuída em fêmeas em resposta à suplementação ($p<0,05$). A expressão de Period1 (Fig. 22G) foi diminuído em fêmeas suplementadas quando comparadas às fêmeas controle ($p<0,001$) e aos machos suplementados ($p<0,001$), mesmo resultado observado para Period2 (Fig. 22H), também diminuído em fêmeas suplementadas quando comparadas às fêmeas controle ($p<0,001$) e aos machos suplementados ($p<0,01$). Por outro lado, a expressão de CCK (Fig. 22J) foi diminuída em machos ($p<0,01$) e fêmeas ($p<0,001$) suplementados. Além disso, a expressão de CCK (Fig. 22J) foi

aumentada em fêmeas controle, quando comparadas aos machos controle ($p < 0,001$) e diminuída em fêmeas suplementadas, quando comparadas aos machos suplementados ($p < 0,001$).

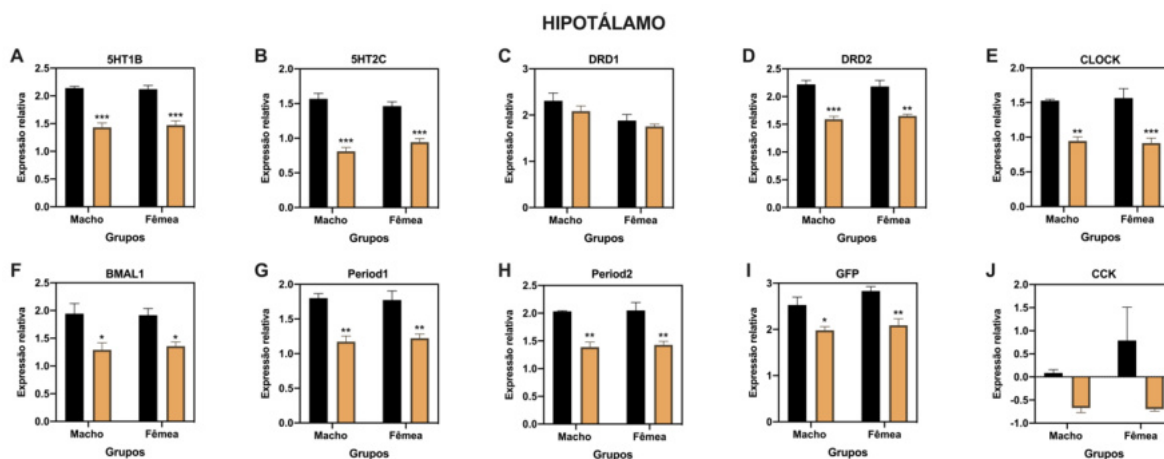
No tronco encefálico (Fig. 23), nenhum efeito da suplementação foi observado em nenhum dos genes estudados, e apenas na expressão de SERT (Fig. 23A) foi observado aumento da expressão em fêmeas controle, quando comparadas aos machos controle.

Figura 20 – Efeitos da suplementação oral de miR-375-3p sobre a expressão de microRNAs no hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico de ratos. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-375-3p ou não no dia 12 de vida e foram desmamados aos 30 dias de vida ($n = 4$ por grupo). Aos 45 dias de vida, os animais foram eutanasiados através de decapitação e as amostras do hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico foram coletadas para posterior análise de expressão gênica. A expressão de miR-375-3p (A, F, K), miR-320-3p (B, G, L), miR-132-3p (C, H, M), miR-504 (D, I, N) e miR-16-5p (E, J, O) foi avaliada no hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$. (*) Efeito da suplementação de miR-375-3p, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



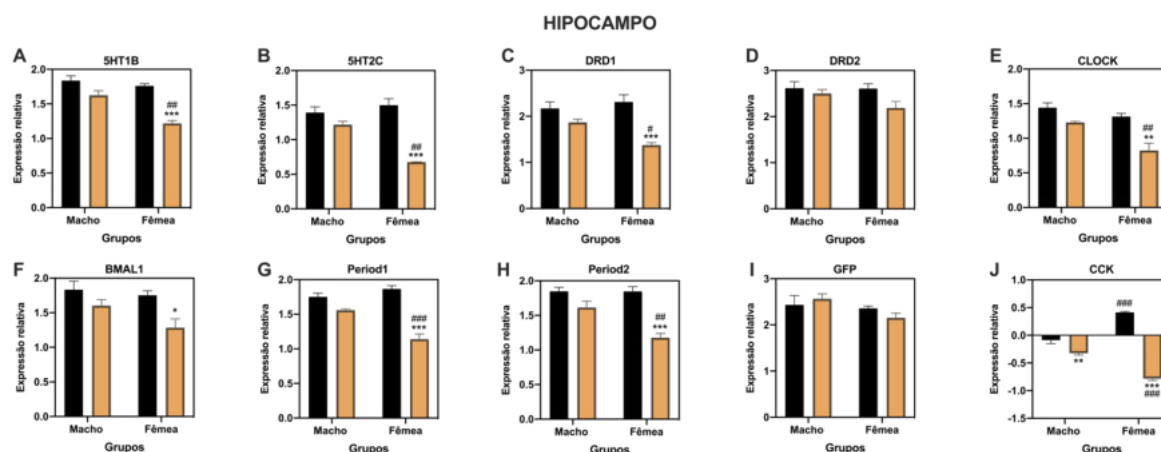
Fonte: Tavares (2021)

Figura 21 – Efeitos da suplementação de miR-375-3p sobre a expressão de mRNAs no hipotálamo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-375-3p ou não no dia 12 de vida e foram desmamados aos 30 dias de vida (n = 4 por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o hipotálamo foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de 5HT1B (A), 5HT2C (B), DRD1 (C), DRD2 (D), CLOCK (E), BMAL1 (F), Period1 (G), Period2 (H), GFP (I) e CCK (J) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (*) Efeito da suplementação de miR-375-3p. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



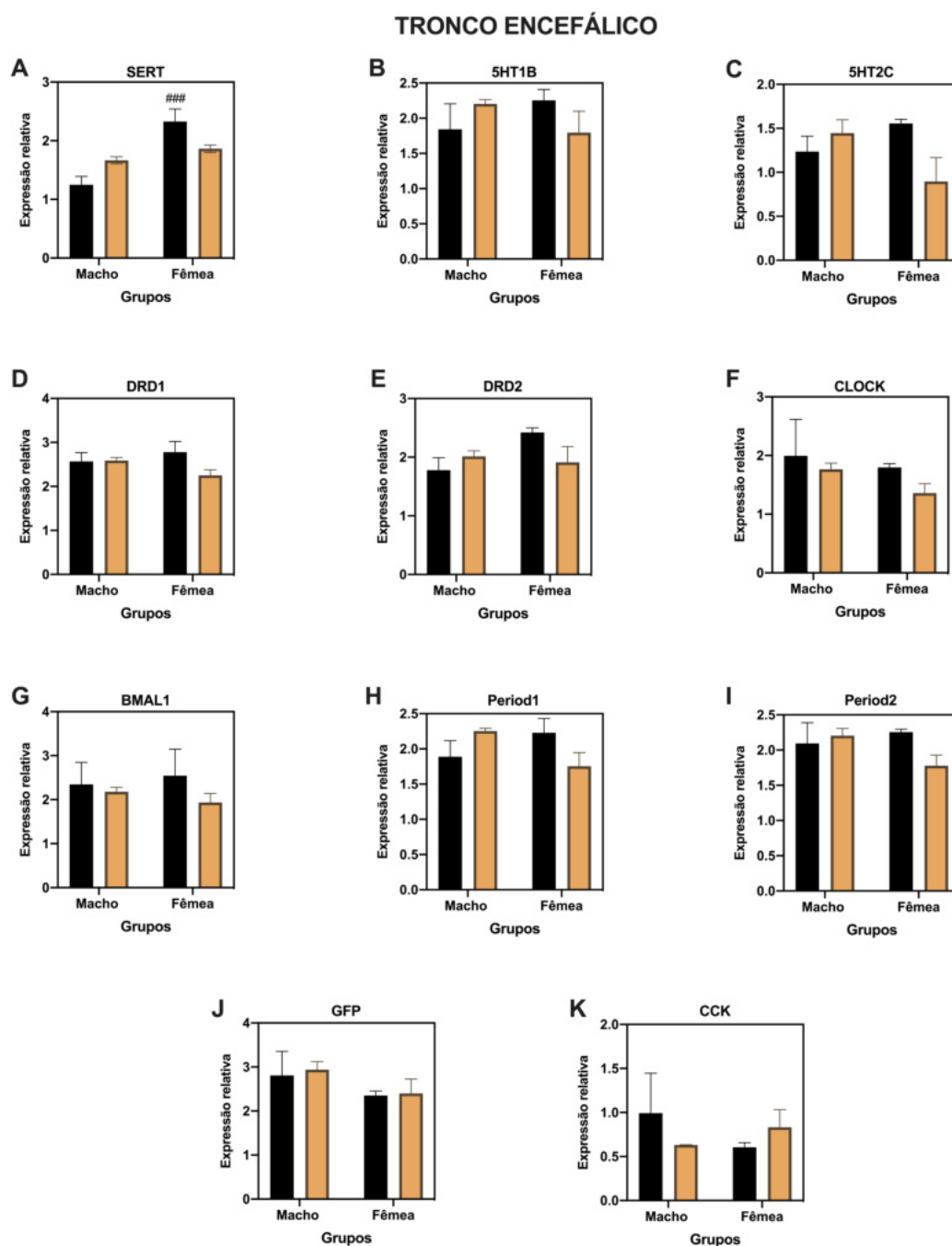
Fonte: Tavares (2021)

Figura 22 – Efeitos da suplementação de miR-375-3p sobre a expressão de mRNAs no hipocampo. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-375-3p ou não no dia 12 de vida e foram desmamados aos 30 dias de vida (n = 4 por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o hipocampo foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de 5HT1B (A), 5HT2C (B), DRD1 (C), DRD2 (D), CLOCK (E), BMAL1 (F), Period1 (G), Period2 (H), GFP (I) e CCK (J) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 (*) Efeito da suplementação de miR-375-3p, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



Fonte: Tavares (2021)

Figura 23 – Efeitos da suplementação de miR-375-3p sobre a expressão de mRNAs no tronco encefálico. Ratos de ambos os sexos foram submetidos a suplementação oral de miR-375-3p ou não no dia 12 de vida e foram desmamados aos 30 dias de vida ($n = 4$ por grupo). Aos 45 dias de vida estes animais foram eutanasiados através de decapitação e o tronco encefálico foi coletado para posterior análises de expressão gênica. A expressão de SERT (A) 5HT1B (B), 5HT2C (C), DRD1 (D), DRD2 (E), CLOCK (F), BMAL1 (G), Period1 (H), Period2 (I), GFP (J) e CCK (K) foi avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão, ### $p < 0,001$, (#) efeito do sexo. Two-way ANOVA com pós-teste de tukey foi utilizado para realização das análises.



Fonte: Tavares (2021)

7 DISCUSSÃO

7.1 EXPERIMENTO I

De acordo com os resultados obtidos na primeira parte dos experimentos, pudemos observar que o desmame precoce promoveu aumento da ingestão alimentar em resposta à privação alimentar de 4h apenas em machos. Em fêmeas, este mesmo resultado foi na direção oposta, apresentando redução na ingestão alimentar. No que diz respeito à ingestão alimentar no ciclo de 24h, apenas machos desmamados precocemente apresentaram alterações no consumo, aumentando a ingestão alimentar.

Estes dados obtidos para os machos, no que diz respeito ao componente homeostático do comportamento alimentar, corrobora com resultados previamente publicados. Oliveira *et al.* (2011) realizou um estudo com o mesmo modelo de desmame precoce, estudando a sequência comportamental de saciedade e ritmo circadiano de alimentação em machos adulto-jovens. Neste estudo, foi observado redução no ponto de saciedade dos animais, com consequente aumento na porção de alimento ingerida (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, Tavares *et al.*, (2020) estudaram o comportamento alimentar de ratos machos em idade jovem, aos 45 dias, e também observaram aumento de ingestão de alimento padrão frente à privação alimentar além de aumento de ingestão durante a fase clara do ciclo circadiano. Além disso, este mesmo estudo avaliou o consumo de alimento padrão frente à utilização aguda de fenfluramina, uma droga inibidora da receptação de serotonina que promove saciedade. Surpreendentemente, observou-se que a fenfluramina apresenta atividade diminuída nos ratos desmamados precocemente, com menor poder de promoção da saciedade (TAVARES *et al.*, 2020b). Nos estudos de Tavares *et al.*, (2020) e Oliveira *et al.* (2011) observamos promoção de hiperfagia tanto em uma idade jovem (45 dias) como em idade adulto-jovem (100 dias) em decorrência do desmame precoce. Com o presente estudo, provamos que o desmame precoce promove hiperfagia em curto, médio e longo prazo, uma vez que neste estudo, o comportamento alimentar foi avaliado entre 250-300 dias de vida, uma idade quase senil para os ratos.

Porém a hiperfagia se mostra consistente ao longo da vida apenas em machos. Até onde sabemos, apenas outro estudo, de Tavares *et al.*, (2019) se propôs a estudar o comportamento alimentar de fêmeas frente ao desmame precoce. Nesse estudo, realizado com fêmeas por volta dos 45 dias de vida, observou-se que o desmame precoce acarreta em perfil semelhante ao dos machos, com hiperfagia e perturbações

no ritmo circadiano de alimentação (TAVARES et al., 2019). Ao contrário dos machos, quando avaliado o comportamento alimentar aos 250-300 dias de vida, as fêmeas desmamadas precocemente apresentaram-se hipofágicas frente à privação alimentar e sem diferença de ingestão em teste de consumo alimentar basal. Estes resultados apontam um diferente efeito do desmame precoce, dependendo do sexo. Enquanto as alterações obtidas em machos se mantêm consistentes ao longo da vida, este mesmo padrão de alterações é diferente nas fêmeas. Interessantemente, em estudo realizado com outro modelo de estresse no início da vida, o estresse por separação materna, observam-se resultados semelhantes em fêmeas de um ano de idade. Neste modelo, os ratos são separados da mãe por algumas horas diariamente durante os primeiros 14 dias de vida. Ratas que foram submetidas à separação materna apresentaram hipofagia associada a antecipação do ponto de saciedade, redução no tamanho da porção do alimento e na duração da refeição aos 365 dias de idade (DE SOUZA et al., 2020). No mesmo estudo, foi observado que o fenótipo hipofágico destas fêmeas se assemelha ao fenótipo de ratas controle sob uso de fluoxetina, outra droga inibidora da receptação de serotonina, conhecida por promover saciedade. Juntos, estes dados apontam alterações no controle da saciedade são dependentes do sexo e da idade, demonstrando que as respostas ao estresse podem ser diferentes de acordo com o sexo, além de que essas alterações podem flutuar ao longo da vida.

Em complemento aos estudos do componente homeostático do comportamento alimentar, também foi realizado o teste de consumo alimentar de alimento palatável, visando avaliar o componente hedônico do comportamento alimentar. Devido a limitações metodológicas, este teste foi realizado apenas em machos, nos quais foi observado que o desmame precoce promove aumento da ingestão de cookies de chocolate. Em um interessante estudo de preferências alimentares em ratos machos adultos (120 dias) desmamados precocemente, Oliveira et al., (2011) demonstrou aumento de preferência por alimentos palatáveis, principalmente aqueles ricos em gordura (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011). Estes resultados, somados aos do presente estudo, apontam que o desmame precoce promove elevada preferência por alimentos palatáveis, o que leva ao maior consumo deste tipo de alimento. Além disso, juntos, estes resultados também apontam que esta alteração no componente hedônico do comportamento alimentar é permanente em longo prazo, pelo menos em machos, e estudos acerca do comportamento alimentar hedônico em fêmeas desmamadas precocemente se fazem bastante necessários.

Além do padrão de consumo alimentar, outro aspecto é bastante avaliado em estudos que avaliam o comportamento alimentar, o peso corporal. No presente estudo, observamos que o peso corporal de ambos machos e fêmeas não sofre alteração, apesar das modificações na ingestão alimentar. O peso corporal de animais desmamado precocemente já foi avaliado em estudos prévios também em diferentes idades. Em machos, o peso corporal de animais desmamados precocemente foi avaliado nas idades 15, 21, 30, 35 e 40, por Tavares et al., (2020) e foi observado aumento do peso apenas no dia 40. Além das análises pontuais, também foi avaliado o percentual de ganho de peso do dia 15 ao dia 21, e do dia 21 ou dia 30. Interessantemente, observou-se que do dia 15 ao dia 21 os animais desmamados precocemente apresentam redução no ganho de peso, com consequente aumento no ganho de peso do dia 21 ao dia 30. Além disso, Oliveira et al., (2011) avaliaram o peso corporal de ratos machos do dia 30 até o dia 150 de idade, a cada 30 dias, e nenhuma diferença é observada. Desta forma, é bem consolidado que o desmame não promove alterações de peso corporal em médio e longo prazo, apesar de modificar o padrão de ganho de peso no início da vida.

Por outro lado, resultados semelhantes são observados em fêmeas. Tavares et al., (2019) também avaliou o peso corporal de fêmeas jovens e observou aumento do peso corporal em fêmeas desmamadas precocemente com idade 35 e 40. Estudos com fêmeas desmamadas precocemente em idades mais avançadas são escassos, porém, de acordo com os dados disponíveis na literatura, podemos observar que tanto para machos quanto para fêmeas desmamados precocemente é observado aumento de peso corporal na juventude, mas essa alteração não permanece em longo prazo.

Além de aspectos comportamentais do comportamento alimentar, avaliações moleculares também são bastante utilizadas para estudá-lo. Isto porque a regulação da ingestão alimentar se dá por uma complexa interação entre sensores nutricionais, hormônios e o sistema nervoso central. No sistema nervoso central, são diversos os circuitos relacionados com o controle da ingestão alimentar, dos quais destacamos os sistemas serotoninérgico e dopaminérgicos. O sistema serotoninérgico está mais intimamente ligado à regulação homeostática da ingestão alimentar, enquanto o sistema dopaminérgico está mais associado com a regulação hedônica do comportamento alimentar. Além disso, populações específicas de neuropeptídeos participam da regulação da saciedade, como NPY e POMC, os quais são diretamente regulados pela ação da serotonina. No presente estudo avaliamos a expressão de

componentes destes sistemas em duas áreas encefálicas, o hipotálamo e o tronco encefálico. Uma das limitações do estudo foi que as análises de biologia molecular só foram possíveis de ser realizadas em animais machos, deixando uma lacuna a respeito dos efeitos moleculares do desmame precoce sobre as fêmeas.

Em relação ao sistema 5HT, os resultados mostram que o desmame precoce promoveu o aumento hipotalâmico da expressão do mRNA de SERT, mas diminuiu a expressão do mRNA do 5HT1B. O sistema 5HT é bem conhecido por sinalizar saciedade através da ação do 5HT nos receptores 5HT1B, que inibe a fome, e nos receptores 5HT2C, que sinalizam saciedade (HEISLER et al., 2006). No hipotálamo, o SERT atua promovendo a recaptação da serotonina para os terminais pré-sinápticos, enquanto o receptor 5HT1B atua estimulando a saciedade ao inibir os neurônios orexígenos no núcleo arqueado (GARFIELD; HEISLER, 2009; HEISLER et al., 2006; MACGILLIVRAY et al., 2010; ROTHMAN; BAUMANN, 2002). O aumento do SERT junto com a diminuição de 5HT1B parece estar relacionado à hiperfagia apresentada pelos animais, uma vez que o aumento da SERT pode levar à menor disponibilidade de serotonina nas fendas sinápticas e a diminuição de 5HT1B pode causar diminuição na sinalização de saciedade. Além disso, a expressão gênica de POMC apresentou-se diminuída no hipotálamo. Este resultado pode ser reflexo da baixa sinalização de serotonina devido ao aumento de SERT, uma vez que os neurônios produtores de POMC precisam ser ativados pela serotonina através de receptores 5HT2C. Assim, ambas as modificações parecem agir sinergicamente no hipotálamo para diminuir a sinalização de saciedade. Interessantemente, aumento nos níveis de SERT também são descritos em animais jovens (TAVARES et al., 2020b), demonstrando que os efeitos do desmame precoce sobre a atividade serotoninérgica possui efeitos duradouros. Apesar de hipotética, esta linha de raciocínio corrobora com os achados comportamentais, uma vez que os animais se apresentaram hiperfágicos.

No tronco cerebral, foi observado aumento da expressão gênica de SERT, 5HT1B e 5HT2C, os quais exercem atividade inibitória sobre os neurônios serotoninérgicos no tronco encefálico (BOOTHMAN et al., 2006; HAGAN et al., 2012; MACGILLIVRAY et al., 2010; SERRATS; MENGOD; CORTÉS, 2005; SPOIDA et al., 2014). Tavares et al., (2019) encontraram o mesmo resultado em ratas jovens e sugeriram que se trata de um mecanismo para inibir a atividade dos neurônios 5HT no tronco encefálico, onde a serotonina é principalmente produzida, especificamente nos núcleos da rafe

(TAVARES et al., 2019). Além disso, Tavares et al., (2020) também demonstraram que ratos machos jovens também apresentam aumento da expressão hipotalâmica de 5HT_{2C} no tronco encefálico. Associando estes resultados, o que parece é que o desmame precoce programa os animais para apresentar uma hipofunção da atividade serotoninérgica, o que também já foi demonstrado em nível farmacológico em machos jovens. Assim, o desmame precoce parece programar os animais para serem hiperfágicos através de redução da atividade serotoninérgica na inibição da ingestão alimentar tanto no hipotálamo como no tronco encefálico. Além disso, os presentes resultados mostram que essa modulação do sistema serotoninérgico é exercida em curto e longo prazo, com caráter permanente.

Por outro lado, o sistema DA tem sido mais associado ao controle da ingestão de alimentos palatáveis, embora evidências também indiquem sua participação na regulação homeostática da ingestão de alimentos (FETISSOV et al., 2002; FRANK et al., 2016; IKEDA et al., 2018; MEGUID et al., 2000; WISE, 1989). Sobre os componentes avaliados do sistema dopaminérgico, encontramos aumento da expressão do mRNA de DRD1 no hipotálamo e aumento da expressão de mRNA de DRD1 e DRD2 no tronco cerebral. Os receptores do tipo D1 apresentam majoritariamente ação pós-sináptica em células receptivas à dopamina (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; JABER et al., 1996; KLEIN et al., 2019; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000). No hipotálamo, os níveis aumentados deste receptor têm sido associados ao aumento da ingestão alimentar padrão e da ingestão alimentar palatável em caso de obesidade (FETISSOV et al., 2002; MIRMOHAMMADSADEGHI et al., 2018). Já os receptores do tipo D2 atuam como receptores pré- e pós-sinápticos, e tem maior atividade de auto receptor reconhecida, tendo maior impacto sobre a inibição da atividade do neurônio DA e consequente liberação de DA (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; KLEIN et al., 2019; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000). No mesencéfalo, a região rostral do tronco encefálico, onde os principais corpos dos neurônios DA são encontrados, especificamente na VTA e na substância negra (SN), a expressão de DRD2 é observada em maiores níveis (KLEIN et al., 2019; MEADOR-WOODRUFF; MANSOUR, 1991). O aumento desse receptor nesta região do tronco cerebral sugere diminuição da atividade dos neurônios DA. Ainda no tronco encefálico, os receptores DRD1 apresentam localização em várias áreas, entre elas os núcleos da rafe, estriado, accumbens substância negra pars reticulada, bulbo olfatório, amígdala e córtex, e parecem estar mais relacionados à sinalização de recompensa

alimentar por meio de circuitos entre os núcleos da rafe, VTA e SN (KLEIN et al., 2019; WISE, 1989). Estudos mostram que o abuso de substâncias promotoras de recompensa é geralmente acompanhado por uma deficiência na sinalização neural dessa recompensa, o que faz com que o indivíduo busque essa recompensa incessantemente (KOOB, 2013). Assim, a possibilidade de inibição de neurônios DA pode estar gerando um mecanismo compensatório, com aumento da expressão de DRD1, na tentativa de sinalizar recompensa. E é essa falha que pode estar associada ao aumento da ingestão de alimentos palatáveis observados aqui, uma vez que os ratos desmamados precocemente parecem precisar comer mais alimentos palatáveis para que a recompensa alimentar seja reconhecida. Esse tipo de efeito causado pelas agressões perinatais é bem descrito na literatura. Roedores submetidos à separação materna neonatal, desnutrição perinatal ou mesmo dietas obesogênicas no período perinatal apresentam aumento da ingestão de alimentos palatáveis e disfunção do sistema dopaminérgico (ALVES et al., 2015; DE SOUZA et al., 2018; FETISSOV et al., 2002; REYNAERT et al., 2015).

Apesar da separação didática entre sistemas hedônico e homeostático, o fato é que não podemos dissociar estes dois componentes. Hoje sabemos que ambos atuam de forma integrada para a expressão de comportamentos. Já sabemos que o sistema 5HT, que por muito tempo foi classificado como um regulador da homeostase, também atua na sinalização hedônica, assim como o sistema DA que há muito foi classificado como um regulador da recompensa alimentar, também atua como um regulador da homeostase. No entanto, apesar dessa dificuldade em associar esses dois sistemas, observamos aqui que o desmame precoce causa um distúrbio central no comportamento alimentar que envolve os sistemas 5HT e DA. Além disso, não podemos assumir esses dados para todos os indivíduos, pois o estudo molecular foi realizado apenas com ratos machos, e sabemos que existem várias diferenças de sexo, como já bem demonstradas previamente, principalmente no que diz respeito à regulação hormonal, que podem afetar os sistemas de neurotransmissão. Assim, mais estudos são necessários para preencher essa lacuna. No entanto, dados moleculares relevantes são apresentados aqui, os quais são consistentes com dados comportamentais e outros dados já apresentados na literatura sobre os efeitos do desmame precoce no comportamento alimentar de longo prazo de ratos.

Em complemento aos testes comportamentais e moleculares no tecido nervoso, algumas análises referentes aos parâmetros metabólicos também foram avaliadas,

como a glicemia, trigliceridemia, colesterolemia e pesos do fígado e do tecido adiposo abdominal. Estas análises se fazem importantes uma vez que modificações na ingestão alimentar, particularmente fenótipos hiperfágicos, geralmente refletem no estado metabólico do indivíduo. Neste estudo observamos que a única alteração em nível metabólico ocorreu nos machos, nos quais os níveis de triglicerídeos encontraram-se diminuídos. Até onde sabemos, não há estudos avaliando estes parâmetros em ratos submetidos ao modelo de desmame precoce avaliado neste estudo, uma vez que este modelo é bastante utilizado em estudos no campo da neurociência. Porém em modelos de desmame precoce alternativos, como aqueles induzidos por administração de bromocriptina ou por utilização de bandagem nas tetas das mães, alguns parâmetros metabólicos são descritos. Ambos os modelos promovem o desmame precoce através da interrupção da produção ou do fornecimento de leite materno durante os últimos dias de lactação (dias 17-21), sem promover a separação entre mãe e filhotes (PEIXOTO-SILVA et al., 2016; YOUNES-RAPOZO et al., 2012). Nos estudos realizados utilizando estes modelos, mudanças metabólicas drásticas são observadas na vida adulta, com características de síndrome metabólica, como sobrepeso, aumento de adiposidade, dislipidemia, mudanças na homeostase glicêmica, hiperleptinemia e aumento nos níveis de vitamina D (LIMA et al., 2013; MIRANDA et al., 2020; PIETROBON et al., 2020).

Os diferentes resultados se dão, sem dúvidas, devido às diferenças metodológicas dos modelos experimentais. Porém, apesar das diferenças, semelhanças entre os modelos também são observadas, como a desregulação do controle cerebral da ingestão alimentar e a hiperfagia. O fato é que, apesar das divergências, ambos os modelos reforçam que o período de amamentação e o cuidado materno são essenciais para o desenvolvimento neurocomportamental adequado. Estes resultados demonstram em nível experimental que é necessário garantir um aleitamento materno adequado, visando um desenvolvimento saudável, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de um comportamento alimentar considerado saudável.

7.2 EXPERIMENTO II

O desmame precoce modulou a expressão de todos os microRNAs avaliados no hipotálamo e hipocampo em ambos os sexos de forma semelhante, porém exerceu efeitos apenas em miR-375-3p, miR-320-3p, miR-132-3p e miR-504 de forma diferenciada entre os sexos no tronco encefálico. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a reportar os efeitos do estresse causado pelo desmame precoce sobre a

expressão gênica de microRNAs no cérebro de ratos. Estes resultados reforçam a suscetibilidade destas moléculas ao estresse promovido na vida precoce. Em artigo de revisão, Tavares et al. (2020) reportaram a modulação da atividade de vários microRNAs em função de estressores ambientais, dentre eles os microRNAs 16, 504 e 132. Estes microRNAs apresentaram sua expressão alterada em regiões como hipotálamo, hipocampo e núcleo accumbens em resposta à estressores como a separação materna, separação materna + estresse crônico imprevisível e desnutrição proteica (TAVARES; TORRES; DE SOUZA, 2020). As alterações de expressão gênica mais expressivas e homogêneas no hipotálamo e hipocampo corroboram com os estudos que já buscaram investigar a associação do estresse com a expressão de microRNAs, uma vez que, em sua maioria, essas alterações são vistas em regiões como hipotálamo e hipocampo (TAVARES; TORRES; DE SOUZA, 2020). Por sua vez, dentre vários estudos avaliados, poucas são as evidências de alterações de expressão gênica de microRNAs no tronco encefálico em resposta ao estresse precoce. De fato, o estresse precoce pode promover alterações em longo prazo na maquinaria genética, influenciando o comportamento ao longo da vida. Em modelos de isolamento social, sabe-se que há influências na regulação genética do comportamento desde a expressão gênica até a atividade de fatores de transcrição, mecanismos epigenéticos, atividade de microRNAs e RNAs longos não codificantes (ARZATE-MEJÍA et al., 2020). Desta forma os resultados aqui apresentados reforçam a suscetibilidade dessa fina maquinaria epigenética, que são os microRNAs, ao estresse precoce, mais especificamente ao desmame precoce.

Quanto aos mRNAs, o desmame precoce promoveu apenas aumento de SERT no tronco encefálico de machos e aumento de 5HT1B e CLOCK no hipocampo de fêmeas. A expressão de SERT já foi descrita como alterada em ratos desmamados precocemente, ambos jovens e adultos. Em fêmeas jovens, SERT encontra-se com expressão elevada no tronco encefálico, porém diminuída no hipotálamo (TAVARES et al., 2019). Em machos, a expressão de SERT é reportada como aumentada no hipotálamo de ratos jovens, sem alterações no tronco encefálico, porém encontra-se elevada em animais adultos em ambas as regiões (TAVARES et al., 2020b, 2020c). Apesar de constatarmos que de fato SERT é sensível ao desmame precoce, algumas limitações fazem difíceis as comparações, como por exemplo a espécie dos animais que diferem entre os estudos, as idades e o sexo. Por sua vez, a expressão de 5HT1B é descrita de forma alterada seja em ratos e camundongos machos como em ratas

fêmeas (NAKAMURA et al., 2008b, dados ainda não publicados) estando associada com comportamentos semelhantes à depressão e à ansiedade. Estes resultados demonstram que mesmo em diferentes espécies, o receptor 5HT1B apresenta-se suscetível ao desmame precoce. Além disso, também observamos alterações nos níveis de CLOCK no hipocampo de fêmeas. Nenhum estudo na literatura buscou avaliar a associação do desmame precoce com os genes osciladores, porém, dados comportamentais sugerem efeitos do desmame precoce sobre estes. Estudos previamente publicados, tanto em machos como em fêmeas, apontam que o desmame precoce altera os padrões circadianos de alimentação seja em idade jovem como adulta (OLIVEIRA et al., 2011; TAVARES et al., 2019, 2020b). Desta forma estes resultados apontam evidências de que existem possíveis alterações moleculares em nível de genes osciladores associadas com a modulação dos ritmos de alimentação em ratos desmamados precocemente.

Interessantemente não foi observada nenhuma associação entre microRNA - mRNA em resposta ao desmame precoce. Sabemos que os miRs 16 e 504 têm como alvo componentes do sistema serotoninérgico e dopaminérgico (SHAO et al., 2018; ZHANG et al., 2013b), porém não foram observadas alterações concomitantes entre os microRNAs e seus genes alvos nas regiões avaliadas. Apesar disso, a alteração na expressão de microRNAs em resposta ao desmame precoce não deve ser subestimada. Sabemos que os microRNAs possuem milhares de possíveis alvos, e por mais que não tenhamos observado associações dos microRNAs com os mRNAs, estes podem estar influenciando diversos outros genes. Desta forma, análises *in silico* para investigar as vias metabólicas e genes alvo dos microRNAs aqui alterados se fazem necessárias para uma maior compreensão dos resultados.

Além do desmame precoce, as investigações acerca da suplementação oral dos microRNAs 320 e 375 apresentou resultados interessantes. No hipotálamo, a suplementação oral de miR-320-3p exerceu efeitos semelhantes ao desmame precoce na expressão dos miRNAs tanto em animais controle como em animais desmamados precocemente. No hipocampo, a expressão de miR-504 foi influenciada pela suplementação de miR320-3p da mesma forma que pelo desmame precoce. Quanto aos mRNAs, a suplementação de miR-320-3p promoveu aumento da expressão de SERT no tronco encefálico semelhante aos efeitos do desmame precoce. Nenhum estudo anterior buscou investigar os efeitos da suplementação oral de miR-320-3p sobre componentes cerebrais. Poucos dos estudos acerca da

atividade de miR-320-3p estão mais restritos à periferia no contexto do diabetes mellitus tipo 2 (BEUZELIN; KAEFFER, 2018). Apesar disso, sabemos que a suplementação oral de miR320-3p através de vesículas biomiméticas é eficiente e deriva no estômago (BEUZELIN; PITARD; KAEFFER, 2019). Aqui, demonstramos que a suplementação pontual de miR-320-3p não só deriva no estômago, mas também é possivelmente absorvida e transportada pela corrente sanguínea por onde chega ao cérebro.

Dos poucos estudos acerca da atividade do miR-320-3p no cérebro, sabemos que a sua expressão é aumentada na VTA em ratos resilientes ao CMS em comparação aos ratos controle e anedônicos. Em contrapartida, a expressão da proteína SERT é diminuída nos animais resilientes no VTA, também quando comparados a controles e anedônicos (ZURAWEK et al., 2017). Apesar disto, nas áreas avaliadas neste estudo não foram observadas nenhuma associação da expressão de miR-320-3p com a expressão de SERT. Apenas foi observado efeito da suplementação sobre a expressão de SERT no tronco encefálico, demonstrando efeito semelhante ao efeito promovido pelo desmame precoce. Além disso, Giorgi Silveira et al. (2020) demonstraram, através de uma revisão sistemática, que a família de miR-320 apresenta hipo-regulação no processo de diferenciação de células tronco neuronais. Dentre as 7 vias significativamente identificadas como associadas a microRNAs hipo-regulados na diferenciação celular de neurônios, os microRNAs da família 320 estão associados com 4, sendo elas glioma, distúrbios transcripcionais no câncer, degradação da lisina e carcinogênese viral (GIORGI SILVEIRA et al., 2020). Devido ao seu possível papel no desenvolvimento de células neuronais, sugerimos que a suplementação aguda de miR-320-3p modulou de alguma forma a atividade de vários outros microRNAs de forma semelhante ao estresse promovido pelo desmame precoce, porém não foram observadas alterações significativas na expressão dos mRNAs aqui estudados. Mais uma vez, estudos *in silicio* se fazem necessários para investigar as possíveis vias de ação tanto do miR-320-3p como dos microRNAs 375, 132, 16 e 504, afim de saber possíveis vias que podem estar alteradas em resposta à suas modulações.

Por sua vez, a suplementação de miR-375-3p modulou apenas a expressão de miR-320-3p no hipotálamo, promovendo aumento na sua expressão em machos e fêmeas. Por outro lado, a suplementação de miR-375-3p promoveu diminuição da expressão de 5HT1B, 5HT2C, DRD2, CLOCK, BMAL1, Period1, Period2 e GFP no

hipotálamo. Já no hipocampo, a suplementação de miR-375-3p promoveu redução na expressão de 5HT1B, 5HT2C, DRD1, CLOCK, BMAL1, Period1 e Period2 apenas em fêmeas.

Assim como o miR-320-3p, pouco se sabe sobre a função do miR-375-3p no cérebro. Do pouco que se sabe, o miR-375-3p é expresso em regiões como pituitária e em menores quantidades no hipotálamo. Até onde se sabe, este microRNA tem papel na função secretora, tendo com alvo a miotrofina, um fator de transcrição que regula fator nuclear kappa B (NF- κ B), que por sua vez atua na modulação do citoesqueleto, estando envolvido com a exocitose (BAROUKH; VAN OBBERGHEN, 2009). Além disso, miR-375-3p é descrito como regulador negativo da expressão de POMC e secreção de hormônios relacionados (ZHANG et al., 2013a). Na adrenal o miR-375-3p também é descrito como regulador negativo da síntese de catecolaminas, influenciando a atividade da TH e dopamina-B-hidroxilase (GAI et al., 2017). Desta forma observamos que, mesmo com poucas evidências, o miR-375-3p apresenta uma importante função na atividade cerebral. Aqui, observamos que, diferentemente dos efeitos da suplementação de miR-320-3p, a suplementação de miR-375-3p influenciou de forma muito mais expressiva a expressão dos mRNAs. O único microRNA afetado pela suplementação foi o miR-320-3p, que foi hiper-regulado em machos e fêmeas. Este é um resultado interessante que demonstra uma possível regulação recíproca entre miR-320-3p e miR-375-3p que merece mais investigações. O interessante é que, de alguma forma, uma única dose de miR-375-3p durante o período pós natal foi capaz de modular a atividade de vários mRNAs de genes que participam da regulação do comportamento em regiões como hipotálamo e hipocampo. Isto pode sugerir que o miR-375-3p é um candidato mais elegível para a modulação de parâmetros comportamentais em detrimento do miR-320-3p. Porém, mais uma vez, mais análises são necessárias para a compreensão das vias pelas quais estes microRNAs podem agir, assim como entender se as modulações promovidas pelo miR-375-3p sobre os mRNAs se dá de forma direta ou indireta.

8 CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados neste estudo, podemos concluir que o desmame precoce altera parâmetros relacionados ao comportamento alimentar em ratos em longo prazo, de forma sexo dependente, destacando-se a hiperfagia e aumento de ingestão de alimento palatável em machos. Além disso, observamos que estas alterações comportamentais são associadas à modulação da atividade dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico.

Por outro lado, o desmame precoce também é capaz de impactar a atividade de vários microRNAs em regiões cerebrais como o hipotálamo, o hipocampo e o tronco encefálico. Interessantemente, a suplementação com miR-320-3p é capaz de prevenir ou de mimetizar os efeitos do desmame precoce sobre alguns genes. Isto demonstra que existe um potencial terapêutico da suplementação com miR-320-3p em frente ao estresse, o que merece mais estudos futuros.

Por sua vez, a suplementação com miR-375-3p alterou a expressão de vários genes relacionados ao controle cerebral do comportamento, porém modulou apenas a expressão de um microRNA, o miR-320-3p. Desta forma observa-se que este miR-375-3p parece ter uma relação de regulação recíproca com o miR-320-3p. Mais investigações são necessárias acerca do papel do miR-375-3p no contexto da regulação do comportamento, seja de forma direta ou indireta.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M. M. I. Central and peripheral control of food intake. **Endocrine Regulations**, v. 51, n. 1, 2017.
- ABRAHAM, K. J. et al. Roles for miR-375 in neuroendocrine differentiation and tumor suppression via notch pathway suppression in merkel cell Carcinoma. **American Journal of Pathology**, 2016.
- ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Spontaneous Novelty Seeking and Amphetamine-induced conditioning and sensitization in adult mice: Evidence of dissociation as a function of age at weaning. **Neuropsychopharmacology**, 2002.
- ALVES, M. B. et al. Increased palatable food intake and response to food cues in intrauterine growth-restricted rats are related to tyrosine hydroxylase content in the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. **Behavioural Brain Research**, v. 287, p. 73–81, 2015.
- ANDERSON, C. E. et al. Every month matters : longitudinal associations between exclusive breastfeeding duration , child growth and obesity among WIC-participating children. **J Epidemiol Community Health**, n. 1, p. 1–7, 2020.
- ANDOLINA, D. et al. Effects of lack of microRNA-34 on the neural circuitry underlying the stress response and anxiety. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 305–316, 2016.
- ANDOLINA, D. et al. Correction to: MicroRNA-34 Contributes to the Stress-related Behavior and Affects 5-HT Prefrontal/GABA Amygdalar System through Regulation of Corticotropin-releasing Factor Receptor 1 (Molecular Neurobiology, (2018), 55, 9, (7401-7412), 10.1007/s12035-018. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 586, 2020.
- ARZATE-MEJÍA, R. G. et al. **Long-Term Impact of Social Isolation and Molecular Underpinnings**Frontiers in Genetics, 2020.
- BAHI, A.; DREYER, J. L. Lentiviral-mediated let-7d microRNA overexpression induced anxiolytic- and anti-depressant-like behaviors and impaired dopamine D3 receptor expression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 12, p. 1394–1404, 2018.
- BAI, M. et al. Abnormal Hippocampal BDNF and miR-16 Expression Is Associated with Depression-Like Behaviors Induced by Stress during Early Life. **PLoS ONE**, 2012.
- BAI, M. et al. Anhedonia was associated with the dysregulation of hippocampal HTR4 and microRNA Let-7a in rats. **Physiology and Behavior**, v. 129, p. 135–141, 2014.
- BALDINI, G.; PHELAN, K. D. **The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications**Journal of Endocrinology, 2019.
- BARAHONA, M. J. et al. Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters

satiety, impacting eating behavior. **Glia**, n. October, p. 1–14, 2017.

BAROUKH, N. N.; VAN OBBERGHEN, E. **Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain****FEBS Journal**, 2009.

BARTEL, D. P. **MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function****Cell**, 2004.

BATRAKOVA, E. V.; KIM, M. S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 2015.

BAUDRY, A. et al. MiR-16 targets the serotonin transporter: A new facet for adaptive responses to antidepressants. **Science**, v. 329, n. 5998, p. 1537–1541, 2010.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. **The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors****Pharmacological Reviews**, 2011.

BELACHEW, A. et al. Prevalence of exclusive breastfeeding practice and associated factors among mothers having infants less than 6 months old, in Bahir Dar, Northwest, Ethiopia: A community based cross sectional study, 2017. **BMC Research Notes**, 2018.

BELFORT, M. B. et al. Breast Milk Feeding, Brain Development, and Neurocognitive Outcomes: A 7-Year Longitudinal Study in Infants Born at Less Than 30 Weeks' Gestation. **Journal of Pediatrics**, v. 177, p. 133- 139.e1, 2016.

BELL, L. K. et al. Poor dietary patterns at 1–5 years of age are related to food neophobia and breastfeeding duration but not age of introduction to solids in a relatively advantaged sample. **Eating Behaviors**, v. 31, n. June, p. 28–34, 2018.

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. **Affective neuroscience of pleasure: Reward in humans and animals****Psychopharmacology**, 2008.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E.; ALDRIDGE, J. W. **Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning****Current Opinion in Pharmacology**, 2009.

BERTHOUD, H.-R. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 04, p. 478–487, 2012.

BERTHOUD, H.; MÜNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Blaming the brain for obesity: Integration of hedonic and homeostatic mechanisms. **Gastroenterology**, 2017.

BEUZELIN, D.; KAEFFER, B. Exosomes and miRNA-loaded biomimetic nanovehicles, a focus on their potentials preventing type-2 diabetes linked to metabolic syndrome. **Frontiers in Immunology**, 2018.

BEUZELIN, D.; PITARD, B.; KAEFFER, B. Oral Delivery of miRNA With Lipidic Aminoglycoside Derivatives in the Breastfed Rat. **Frontiers in Physiology**, 2019.

BINNS, C.; LEE, M.; LOW, W. Y. The Long-Term Public Health Benefits of Breastfeeding. **Asia-Pacific Journal of Public Health**, 2016.

BLUNDELL, J. E. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. **Appetite**, v. 7, p. 39–56, 1986.

BOCCOLINI, C. S. et al. Breastfeeding indicators trends in Brazil for three decades. **Revista de saude publica**, 2017a.

BOCCOLINI, C. S. et al. Breastfeeding indicators trends in Brazil for three decades. **Revista de Saúde Pública**, 2017b.

BODNAR, R. J. Conditioned flavor preferences in animals: Merging pharmacology, brain sites and genetic variance. **Appetite**, 2018.

BOOTHMAN, L. et al. In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 7, p. 861–869, 2006.

CAI, S. et al. Infant feeding effects on early neurocognitive development in Asian children. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 114, p. 69–70, 2016.

CARRUBA, M. O. et al. Peripheral and central mechanisms of action of serotonergic anorectic drugs. **Appetite**, v. 7, p. 105–113, 1986.

CHMIELARZ, P. et al. Dicer and microRNAs protect adult dopamine neurons. **Cell death & disease**, v. 8, n. 5, p. e2813, 2017.

D'AGOSTINO, G. et al. Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. **eLife**, v. 5, n. MARCH2016, 2016.

DE ALMEIDA, C. R. et al. Exposure to breastfeeding and common mental disorders in adolescence. **Cadernos de Saude Publica**, v. 35, n. 5, 2019.

DE BARSE, L. M. et al. Infant feeding and child fussy eating: The Generation R Study. **Appetite**, v. 114, p. 374–381, 2017.

DE SOUZA, J. A. et al. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. **Appetite**, v. 123, p. 114–119, 2018.

DE SOUZA, J. A. et al. Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, p. 172908, mar. 2020.

DENNIS, C. L. et al. Prevalence and predictors of exclusive breastfeeding among immigrant and Canadian-born Chinese women. **Maternal and Child Nutrition**, 2019.

DOS SANTOS OLIVEIRA, L. et al. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. **Behavioural Processes**, v. 86,

n. 1, p. 75–80, 2011.

EICKMANN, S. H. et al. Breast feeding and mental and motor development at 12 months in a low-income population in northeast Brazil. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 21, n. 2, p. 129–137, 2007.

FETISSOV, S. O. et al. Expression of dopaminergic receptors in the hypothalamus of lean and obese Zucker rats and food intake. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 2002.

FRANK, S. et al. Dopamine depletion reduces food-related reward activity independent of BMI. **Neuropsychopharmacology**, 2016.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. **Leptin and the regulation of body weight in mammals**Nature, 1998.

FRIZZO, M. E. **Can a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Act as a Glutamatergic Modulator?**Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental, 2017.

FUNDAÇÃO ABRINQ. **Cenário da Infância e Adolescência no Brasil**. [s.l: s.n.].

GAI, Y. et al. MiR-375 negatively regulates the synthesis and secretion of catecholamines by targeting Sp1 in rat adrenal medulla. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 2017.

GANGISETTY, O. et al. MicroRNA-9 regulates fetal alcohol-induced changes in D2 receptor to promote prolactin production. **Journal of Endocrinology**, v. 235, n. 1, p. 1–14, 2017.

GARCIA, A. H. et al. Maternal weight status, diet, and supplement use as determinants of breastfeeding and complementary feeding: A systematic review and meta-analysis. **Nutrition Reviews**, 2016.

GARDANEH, M. **Dopamine-synthesizing neurons: An overview of their development and application for cell therapy**Iranian Journal of Biotechnology, 2010.

GARFIELD, A. S.; HEISLER, L. K. **Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity**. Journal of Physiology. **Anais...**2009

GIORGI SILVEIRA, R. et al. **MicroRNAs expressed in neuronal differentiation and their associated pathways: Systematic review and bioinformatics analysis**Brain Research Bulletin, 2020.

GRACE, T. et al. Breastfeeding and motor development: A longitudinal cohort study. **Human Movement Science**, v. 51, p. 9–16, 2017.

GRUMMER-STRAWN, L. M.; ROLLINS, N. **Summarising the health effects of breastfeeding**Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, 2015.

GU, J. et al. Vesicle miR-195 derived from Endothelial Cells Inhibits Expression of Serotonin Transporter in Vessel Smooth Muscle Cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–10, 2017.

GUZZARDI, M. A. et al. Exclusive Breastfeeding Predicts Higher Hearing-Language Development in Girls of Preschool Age. **Nutrients**, v. 12, n. 8, 2020.

HAGAN, C. E. et al. 5-HT_{1B} autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. **Synapse**, v. 66, n. 12, p. 1024–1034, 2012.

HALFORD, J. C. G.; WANNINAYAKE, S. C. D.; BLUNDELL, J. E. **Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1998.

HEISLER, L. K. et al. Serotonin Reciprocally Regulates Melanocortin Neurons to Modulate Food Intake. **Neuron**, 2006.

HERRING, A. et al. Breastfeeding History, Preschool Children's Sleep, and Obesity. **Comprehensive Child and Adolescent Nursing**, v. 00, n. 00, p. 1–11, 2020.

HERWIJNEN, M. J. C. VA. et al. Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. **Frontiers in Nutrition**, 2018.

HUANG, T. et al. Infant Breastfeeding and Behavioral Disorders in School-Age Children. **Breastfeeding Medicine**, v. 14, n. 2, p. 115–120, 2019.

HUME, C.; JACHS, B.; MENZIES, J. Homeostatic Responses to Palatable Food Consumption in Satiated Rats. v. 24, n. 10, p. 2126–2132, 2016.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. **Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay** *Nature Reviews Genetics*, 2011.

IKEDA, H. et al. Pregabalin increases food intake through dopaminergic systems in the hypothalamus. **Brain Research**, 2018.

ISHIWATA, T.; HASEGAWA, H.; GREENWOOD, B. N. Involvement of serotonin in the ventral tegmental area in thermoregulation of freely moving rats. **Neuroscience Letters**, v. 653, p. 71–77, 2017.

ISSLER, O. et al. MicroRNA 135 is essential for chronic stress resiliency, antidepressant efficacy, and intact serotonergic activity. **Neuron**, v. 83, n. 2, p. 344–360, 2014.

ITO, A. et al. Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 171, n. 1, p. 87–93, 2006.

IWATA, E. et al. Fostering and environmental enrichment ameliorate anxious behavior induced by early weaning in Balb/c mice. **Physiology and Behavior**, v. 91,

n. 2–3, p. 318–324, 2007.

JABER, M. et al. **Dopamine receptors and brain function** *Neuropharmacology*, 1996.

JENSEN, K. P. et al. A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 4, p. 381–389, 2009.

JIA, X. et al. miR-137 and miR-491 Negatively Regulate Dopamine Transporter Expression and Function in Neural Cells. **Neuroscience Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 512–522, 2016.

KANARI, K. et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 45–52, 2005.

KIKUSUI, T. et al. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 96–103, 2006.

KIKUSUI, T. et al. Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. **Developmental Psychobiology**, v. 58, n. 8, p. 1101–1107, 2016.

KIKUSUI, T. et al. Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

KIKUSUI, T.; ICHIKAWA, S.; MORI, Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. **Psychoneuroendocrinology**, 2009.

KIKUSUI, T.; ISAKA, Y.; MORI, Y. Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 2, p. 200–206, 2005.

KIKUSUI, T.; KIYOKAWA, Y.; MORI, Y. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain Research**, v. 1133, n. 1, p. 115–122, 2007a.

KIKUSUI, T.; KIYOKAWA, Y.; MORI, Y. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain Research**, 2007b.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. **Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents**. *Journal of Neuroendocrinology*. **Anais...**2009

KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. **Physiology and Behavior**, 2004.

KIM, H. K. et al. Plasma microRNA expression levels and their targeted pathways in patients with major depressive disorder who are responsive to duloxetine treatment.

Journal of Psychiatric Research, v. 110, n. December 2018, p. 38–44, 2019.

KISHORE, R.; KHAN, M. **More Than Tiny Sacks: Stem Cell Exosomes as Cell-Free Modality for Cardiac Repair***Circulation Research*, 2016.

KLEIN, M. O. et al. **Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases***Cellular and Molecular Neurobiology*, 2019.

KODAMA, Y. et al. Effects of early weaning on anxiety and prefrontal cortical and hippocampal myelination in male and female Wistar rats. **Developmental Psychobiology**, v. 50, n. 4, p. 332–342, 2008.

KOOB, G. F. Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. **Frontiers in Psychiatry**, 2013.

KOSHIYAMA, D. et al. Association between duration of breastfeeding based on maternal reports and dorsal and ventral striatum and medial orbital gyrus volumes in early adolescence. **NeuroImage**, v. 220, n. January, p. 117083, 2020.

KOWAL, J.; TKACH, M.; THÉRY, C. **Biogenesis and secretion of exosomes***Current Opinion in Cell Biology*, 2014.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay***Nature Reviews Genetics*, 2010.

LAUNAY, J. M. et al. Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. **Translational Psychiatry**, v. 1, n. August, p. 1–8, 2011.

LEVENTAKOU, V. et al. Breastfeeding duration and cognitive, language and motor development at 18 months of age: Rhea mother-child cohort in Crete, Greece. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 69, n. 3, p. 232–239, 2015.

LI, S. P. et al. **Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools***Acta Pharmacologica Sinica*, 2018.

LIAO, X. J. et al. MicroRNA-24 inhibits serotonin reuptake transporter expression and aggravates irritable bowel syndrome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 2, p. 288–293, 2016.

LIMA, N. S. et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. **Hormone and Metabolic Research**, 2013.

LIN, C. C. et al. Antidepressant treatment increased serum miR-183 and miR-212 levels in patients with major depressive disorder. **Psychiatry Research**, v. 270, n. April, p. 232–237, 2018.

LIU, D. et al. Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659–1662, 1997.

LIU, Y. et al. Early adolescent stress-induced changes in prefrontal cortex miRNA-135a and hippocampal miRNA-16 in male rats. **Developmental Psychobiology**, v. 59, n. 8, p. 958–969, 2017.

LIU, Z.; SALL, A.; YANG, D. **MicroRNA: An emerging therapeutic target and intervention tool** *International Journal of Molecular Sciences*, 2008.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiology and Behavior**, v. 82, n. 2–3, p. 375–379, 2004.

MACGILLIVRAY, L. et al. Role of serotonin transporter inhibition in the regulation of tryptophan hydroxylase in brainstem raphe nuclei: Time course and regional specificity. **Neuroscience**, 2010.

MAVRIKAKI, M. et al. Overexpression of miR-9 in the Nucleus Accumbens Increases Oxycodone Self-Administration. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 383–393, 2019.

MAZO-TOMÉ, P. L. DEL; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, M. Prevalence of exclusive breastfeeding in the healthy newborn. **Boletín Medico del Hospital Infantil de México**, 2018.

MEADOR-WOODRUFF, J. H.; MANSOUR, A. A. E. Bennett Award paper. Expression of the dopamine D2 receptor gene in brain. **Biological psychiatry**, 1991.

MEGUID, M. M. et al. **Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake**. Nutrition. **Anais...**2000

MIRANDA, R. A. et al. Early weaning leads to specific glucocorticoid signalling in fat depots of adult rats. **Endocrine**, 2020.

MIRMOHAMMADSADEGHI, Z. et al. Role of paraventricular hypothalamic dopaminergic D 1 receptors in food intake regulation of food-deprived rats. **European Journal of Pharmacology**, 2018.

MISHRA, A.; SINGH, S.; SHUKLA, S. **Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease** *Journal of Experimental Neuroscience*, 2018.

MONTAGUE, C. T. et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 903–908, 1997.

MOYA, P. R. et al. MiR-15a and miR-16 regulate serotonin transporter expression in human placental and rat brain raphe cells. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 3, p. 621–629, 2013.

NAKAMURA, K. et al. The influence of early weaning on aggressive behavior in mice. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 12, p. 1347–1349, 2003.

NAKAMURA, K. et al. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 2, p. 442–448, 2008a.

NAKAMURA, K. et al. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 2, p. 442–448, 2008b.

O'CARROLL, D.; SCHAEFER, A. **General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain** *Neuropsychopharmacology*, 2013.

OLIVEIRA, S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 1, p. 119–124, 2011.

ONO, M. et al. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 1103–1110, 2008.

ORENGUL, A. C. et al. Duration of Breastfeeding, Bottle-Feeding, and Parafunctional Oral Habits in Relation to Anxiety Disorders among Children. **Breastfeeding Medicine**, v. 14, n. 1, p. 57–62, 2019.

PALACIOS, J. M. Serotonin receptors in brain revisited. **Brain Research**, v. 1645, p. 46–49, 2015.

PALASKA, E. et al. Association Between Breastfeeding and Obesity in Preschool Children. **Materia Socio Medica**, v. 32, n. 2, p. 117, 2020.

PANARELLI, N. et al. Evaluating gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through microRNA sequencing. **Endocrine-Related Cancer**, 2019.

PATTON, D. F.; MISTLBERGER, R. E. **Circadian adaptations to meal timing: Neuroendocrine mechanisms** *Frontiers in Neuroscience*, 2013.

PEIXOTO-SILVA, N. et al. Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring *British Journal of Nutrition*. n. 2015, p. 536–545, 2016.

PERES, K. G. et al. Breastfeeding and Oral Health: Evidence and Methodological Challenges. **Journal of Dental Research**, 2018.

PHILLIPS, A. G.; VACCA, G.; AHN, S. **A top-down perspective on dopamine, motivation and memory** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2008.

PIETROBON, C. B. et al. Body Adiposity and Endocrine Profile of Female Wistar Rats of Distinct Ages that were Early Weaned. **Hormone and Metabolic Research**, 2020.

QIAO, J. et al. A meta-analysis of the association between breastfeeding and early childhood obesity. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 53, p. 57–66, 2020.

RAMIRO GONZÁLEZ, M. D. et al. Prevalence of breastfeeding and factors associated with the start and duration of exclusive breastfeeding in the Community of Madrid among participants in the ELOIN. **Anales de Pediatría**, 2018.

RAVANIDIS, S. et al. Validation of differentially expressed brain-enriched microRNAs in the plasma of PD patients. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, 2020.

REYNAERT, M. et al. Hedonic sensitivity to natural rewards is affected by prenatal stress in a sex-dependent manner. 2015.

RICHARDS, M.; HARDY, R.; WADSWORTH, M. E. Long-term effects of breast-feeding in a national birth cohort: educational attainment and midlife cognitive function. **Public Health Nutrition**, v. 5, n. 5, p. 631–635, 2002.

RODRIGUES, K. DOS S. et al. **Early weaning alters redox status in the hippocampus and hypothalamus of rat pups**. [s.l: s.n.].

ROMAN, C. W.; SLOAT, S. R.; PALMITER, R. D. A tale of two circuits: CCKNTS neuron stimulation controls appetite and induces opposing motivational states by projections to distinct brain regions. **Neuroscience**, 2017.

ROTHMAN, R. B.; BAUMANN, M. H. Serotonin releasing agents: Neurochemical, therapeutic and adverse effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2002.

RUIZ, J. M. P. et al. Lactancia materna y su influencia en los procesos cognitivos de escolares españoles (6 años de edad), valorada con la escala de inteligencia Wechsler. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 63, n. 3, p. 218–223, 2013.

SANTOS, I. S. et al. Breastfeeding exclusivity and duration: Trends and inequalities in four population-based birth cohorts in Pelotas, Brazil, 1982-2015. **International Journal of Epidemiology**, 2019.

SAYRES, S.; VISENTIN, L. **Breastfeeding: Uncovering barriers and offering solutions** *Current Opinion in Pediatrics*, 2018.

SCHWARTZ, G. J.; ZELTSER, L. M. Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. **Annual review of nutrition**, v. 33, p. 1–21, jan. 2013.

SEPEHRMANESH, Z. et al. Breast Feeding Duration and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Acta Scientifci Nutritional Health**, v. 4, n. 2, p. 01–06, 2020.

SERRATS, J.; MENGOD, G.; CORTÉS, R. Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 29, n. 2, p. 83–91, 2005.

SHAO, Q. Y. et al. CSF miR-16 expression and its association with miR-16 and serotonin transporter in the raphe of a rat model of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 238, n. 305, p. 609–614, 2018.

SHI, S. et al. MicroRNA-9 and microRNA-326 regulate human dopamine D2 receptor expression, and the microRNA-mediated expression regulation is altered by a genetic variant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 19, p. 13434–13444, 2014.

SHIM, J. E. et al. Associations of infant feeding practices and picky eating behaviors of preschool children. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 9, p. 1363–1368, 2011.

SHIMOZURU, M. et al. Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of wistar rats. **Developmental Psychobiology**, v. 49, n. 4, p. 343–350, 2007.

SILVA, V. A. A. L. et al. Maternal breastfeeding: indicators and factors associated with exclusive breastfeeding in a subnormal urban cluster assisted by the Family Health Strategy. **Jornal de Pediatria**, 2019.

SIMON, J. J. et al. Integration of homeostatic signaling and food reward processing in the human brain. p. 1–17, 2017.

SONG, M. F. et al. CSF miR-16 is decreased in major depression patients and its neutralization in rats induces depression-like behaviors via a serotonin transmitter system. **Journal of Affective Disorders**, v. 178, p. 25–31, 2015.

SPECHT, I. O. et al. Duration of exclusive breastfeeding may be related to eating behaviour and dietary intake in obesity prone normal weight young children. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–11, 2018.

SPENCER, W. C.; DENNERIS, E. S. Regulatory Mechanisms Controlling Maturation of Serotonin Neuron Identity and Function. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 2017.

SPOIDA, K. et al. Gq/5-HT_{2c} receptor signals activate a local GABAergic inhibitory feedback circuit to modulate serotonergic firing and anxiety in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2014.

STOJAKOVIC, A. et al. Effects of nicotine on homeostatic and hedonic components of food intake. 2017.

SUTIN, A. R.; STEPHAN, Y.; TERRACCIANO, A. Breastfeeding and Adult Personality. **European Journal of Personality**, v. 30, n. 5, p. 484–491, 2016.

TAKITA, M.; KIKUSUI, T. Early weaning augments the spontaneous release of dopamine in the amygdala but not the prefrontal cortex: An in vivo microdialysis study of male rats. **Experimental Animals**, 2020.

TAVARES, G. A. et al. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats

through 5HT-system modulations. **Behavioural Processes**, nov. 2019.

TAVARES, G. A. et al. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations. **Behavioural Processes**, v. 170, n. September 2019, p. 103981, 2020a.

TAVARES, G. A. et al. Early weaning modulates eating behavior and promotes hypofunction of the serotonergic (5HT) system in juvenile male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, p. jdn.10018, 21 fev. 2020b.

TAVARES, G. A. et al. Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 383, 6 abr. 2020c.

TAVARES, G. A.; TORRES, A.; DE SOUZA, J. A. **Early Life Stress and the Onset of Obesity: Proof of MicroRNAs' Involvement Through Modulation of Serotonin and Dopamine Systems' Homeostasis** *Frontiers in Physiology*, 2020.

TERRANOVA, M. L. et al. Attractivity and social preferences in mice (*Mus musculus domesticus*): The role of prepubertal sexual segregation and of precocious weaning. **Journal of Comparative Psychology**, v. 114, n. 4, p. 325–334, 2000.

TERRANOVA, M. L.; LAVIOLA, G. δ -Opioid modulation of social interactions in juvenile mice weaned at different ages. **Physiology and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 393–400, 2001.

TESSON, L. et al. **Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs** *Nature Biotechnology*, 2011.

TOBÓN, K. E. et al. Post-transcriptional regulation of dopamine D1 receptor expression in caudate-putamen of cocaine-sensitized mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 2, p. 1849–1857, 2015.

TOBÓN, K. E.; CHANG, D.; KUZHIKANDATHIL, E. V. MicroRNA 142-3p Mediates Post-Transcriptional Regulation of D1 Dopamine Receptor Expression. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

TRUSCOTT, M.; ISLAM, A. B. M. M. K.; FROLOV, M. V. Novel regulation and functional interaction of polycistronic miRNAs. **RNA**, 2016.

TSENG, P. T. et al. Maternal breastfeeding and attention-deficit/hyperactivity disorder in children: a meta-analysis. **European Child and Adolescent Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 19–30, 2019.

TSHERING, D. et al. Prevalence of Exclusive Breastfeeding and Factors Associated With Exclusive Breastfeeding of Children in Trongsa District, Bhutan. **Asia-Pacific Journal of Public Health**, 2018.

TUOMINEN, L. et al. NeuroImage Aberrant mesolimbic dopamine – opiate interaction in obesity. **NeuroImage**, v. 122, p. 80–86, 2015.

UNICEF. Global Breastfeeding Scorecard 2019. **Global Breastfeeding Scorecard**, 2019.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. **Structure and function of dopamine receptors**. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. **Anais...**2000

VENTURA, A. K. Does Breastfeeding Shape Food Preferences? Links to Obesity. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, n. 3, p. 8–15, 2017.

VOIGT, J. P.; FINK, H. **Serotonin controlling feeding and satiety** **Behavioural Brain Research**, 2015.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; BALER, R. D. **Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity** **Trends in Cognitive Sciences**, 2011.

VOLPICELLI, F. et al. The microRNA-29a Modulates Serotonin 5-HT₇ Receptor Expression and Its Effects on Hippocampal Neuronal Morphology. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 12, p. 8617–8627, 2019.

WANG, P. et al. D2 receptor-mediated miRNA-143 expression is associated with the effects of antipsychotic drugs on phencyclidine-induced schizophrenia-related locomotor hyperactivity and with Neuregulin-1 expression in mice. **Neuropharmacology**, v. 157, n. May, p. 107675, 2019.

WHO. **Indicators for assessing infant and young child feeding practices** **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**. [s.l.: s.n.].

WISE, R. Brain Dopamine And Reward. **Annual Review of Psychology**, 1989.

WOHLFARTH, C. et al. MiR-16 and miR-103 impact 5-HT₄ receptor signalling and correlate with symptom profile in irritable bowel syndrome. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

WU, D. M. et al. Inhibition of microRNA-200a upregulates the expression of striatal dopamine receptor d2 to repress apoptosis of striatum via the cAMP/PKA signaling pathway in rats with Parkinson's disease. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 1600–1615, 2018.

WU, X. et al. MicroRNA-15a, microRNA-15b and microRNA-16 inhibit the human dopamine D1 receptor expression in four cell lines by targeting 3'UTR –12 bp to + 154 bp. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 276–287, 2020.

XIE, L. et al. MicroRNA-26a-2 maintains stress resiliency and antidepressant efficacy by targeting the serotonergic autoreceptor HTR1A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 511, n. 2, p. 440–446, 2019.

YAN, J. et al. The association between breastfeeding and childhood obesity: A meta-analysis. **BMC Public Health**, 2014.

YAN, X. et al. Differential impact of glucose administered intravenously and orally on circulating MIR-375 levels in human subjects. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2017.

YANG, Y. et al. miR-16 and fluoxetine both reverse autophagic and apoptotic change in chronic unpredictable mild stress model rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. JUL, p. 1–18, 2017.

YI-HAO YU. Making sense of metabolic obesity and hedonic obesity. **Journal of Diabetes**, 2017.

YOON, Y. J. et al. Anxiety-associated alternative polyadenylation of the serotonin transporter mRNA confers translational regulation by hnRNPK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. 11624–11629, 2013.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Early weaning is associated with higher neuropeptide y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 12, p. 2286–2295, 2012.

YOUNG, A. A. Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 31–45, jul. 2012.

ZANCHI, D. et al. **The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: A systematic review** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2017.

ZHANG, L.; HERNANDEZ-SANCHEZ, D.; HERZOG, H. **Regulation of feeding-related behaviors by arcuate neuropeptide Y neurons** *Endocrinology*, 2019.

ZHANG, N. et al. MicroRNA 375 mediates the signaling pathway of corticotropin-releasing factor (CRF) regulating pro-opiomelanocortin (POMC) Expression by targeting Mitogen-activated protein Kinase 8. **Journal of Biological Chemistry**, 2013a.

ZHANG, X.; POL, A. N. VAN DEN. Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. n. August, 2016.

ZHANG, Y. et al. Maternal Deprivation Enhances Behavioral Vulnerability to Stress Associated with miR-504 Expression in Nucleus Accumbens of Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013b.

ZHANG, Y. et al. Dopamine receptor D2 and associated microRNAs are involved in stress susceptibility and resistance to escitalopram treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. 1–10, 2015.

ZHAO, J. et al. Effect of Electroacupuncture on Reuptake of Serotonin via miRNA-16 Expression in a Rat Model of Depression. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

ZHAO, Y. et al. Memory retrieval in addiction: A role for miR-105-mediated regulation of D1 receptors in mPFC neurons projecting to the basolateral amygdala. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2017.

ZISOULIS, D. G. et al. Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. **Nature**, 2012.

ZURAWEK, D. et al. Reciprocal MicroRNA Expression in Mesocortical Circuit and Its Interplay with Serotonin Transporter Define Resilient Rats in the Chronic Mild Stress. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 5741–5751, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL “EARLY WEANING LEADS TO DISRUPTION OF HOMEOSTATIC AND HEDONIC EATING BEHAVIORS AND MODULATES SEROTONIN (5HT) AND DOPAMINE (DA) SYSTEMS IN MALE ADULT RATS.”

Behavioural Brain Research 383 (2020) 112531



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats



Gabriel Araújo Tavares^{a,e,*}, Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida^b, Julliet Araújo de Souza^b, Victor Vasconcelos de Farias^d, Felipe Leitão de Souza^a, Severina Cassia de Andrade Silva^b, Claudia Jacques Lagranha^{b,c}, Bertrand Kaefter^e, Sandra Lopes de Souza^{a,b}

^a Graduate Program of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^b Graduate Program of Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^c Academic Center of Vitória (CAV), Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

^d Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

^e Nantes Université, INRAE, UMR 1280, PhAN, F-44000, Nantes, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Eating behavior
Early weaning
Serotonin
Dopamine
Hypothalamus
Brainstem

ABSTRACT

Early weaning is associated with disruption of eating behavior. However, little is known about the mechanisms behind it. 5HT and DA systems are key regulators of homeostatic and hedonic eating behaviors, respectively. Thus, this study aims to evaluate the effects of early weaning on feeding behavior and 5HT and DA systems. For this, rats were submitted to regular (PND30) or early weaning (PND15) and between PND250 and PND300 were evaluated food intake of standard diet in response to 4 h food deprivation, during the 24 h period and per phase of the circadian cycle, in addition to the palatable food intake. Additionally, body mass and mRNA expression of 5HT1B, 5HT2C, SERT, DRD1 and DRD2 were evaluated in the hypothalamus and brainstem. The results demonstrate that early weaning promoted an increase in standard food intake in response to a 4 h food deprivation in the 24 h period and in the dark phase of the circadian cycle, in addition to an increased palatable food intake. No differences in body mass between regular or early weaning were observed. In the hypothalamus, increased mRNA expression of SERT and DRD1 was observed, but decreased 5HT1B mRNA expression. In the brainstem, the expression of 5HT1B, SERT, 5HT2C, DRD1 and DRD2 was increased in early weaned rats. In a nutshell, the stress promoted by early weaning has programmed the animals to be hyperphagic and to increase their palatable food intake, which was associated with modulation of 5HT and DA systems.

1. Introduction

During the early stages of life mammals are quite susceptible to environmental influences [1–3]. Several studies show that during pregnancy and lactation, environmental stimuli can even permanently affect the growth and development of individuals [4–8]. One of the main systems affected by these stimuli is the central nervous system, precisely because it is in an intense process of development in the early stages of life [9,10]. As this system is responsible for the formation of neurobehavioral patterns in individuals, disturbances in their development can modulate the development of these patterns even permanently.

Among the environmental factors that can modulate the development of the central nervous system are stressors. Several rodent studies have shown that adverse conditions such as malnutrition or even changes in maternal care during pregnancy and lactation may impair neurobehavioral development [11–15]. In animals submitted to neonatal stress due to maternal separation, several neurobehavioral alterations are observed, such as increased anxiety-like behavior [16], alterations of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis [14,17], and changes in feeding behavior [8,18,19]. When submitted to early weaning, rodents show increased anxiety-like behavior, changes in eating behavior, increased response to stressors agents and decreased social interaction [20–26].

* Corresponding author at: UMR-1280 PhAN (Physiologie des Adaptations Nutritionnelles), CHU – Hôtel Dieu - HNB1, Place Alexis Ricordeau, 44093, NANTES Cedex 1, France.

E-mail address: gabrieltavaresufpe@outlook.com (G.A. Tavares).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112531>

Received 5 December 2019; Received in revised form 13 January 2020; Accepted 31 January 2020

Available online 31 January 2020

0166-4328/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Early weaning is an experimental model consisting of abrupt and early interruption of the lactation in rats [23,25,27]. Thus, rats are precociously deprived of two important factors in modulating proper development, maternal care and lactation. Regarding feeding behavior, it is already observed that animals of both sexes submitted to early weaning have hyperphagia and males have increased palatable food intake [24–26]. However, little is known about the neurophysiological mechanisms behind these changes in these animals. What is currently known is that young females present modifications of gene expression in the serotonergic system, which seems to be related to the hyperphagia observed in these animals [26].

The serotonergic system is precisely related to the control of food intake, as it signals satiety in the hypothalamus [28–30]. Also, the dopaminergic system is closely related to hedonic eating behavior, which is related to food reward, and is even associated with obesity when altered [31–33]. Due to this, our hypothesis is that the changes on feeding behavior observed in early weaned animals are due to disruption of 5HT and DA systems. Thus, this study aims to investigate the effects of early weaning on feeding behavior as well as mRNA expression of key compounds of 5HT and DA systems in rats.

2. Material and methods

2.1. Animals

Female Wistar rats ($n = 10$) were obtained from the colony of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco. When pregnant, rats were kept individually in cages, in facilities with constant conditions of temperature (20°C), luminosity (12–12 h cycle, lights on at 6 pm) and free access to water and commercial laboratory chow (Presença®). At PND01, the litters were culled to 8 pups (4 males and 4 females, always as possible). Animal care comply with the ARRIVE guidelines and followed the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978), being conducted in agreement of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA), with the approval of the Animal Ethical Committee of the Federal University of Pernambuco (n° : 0020/2018).

2.2. Early weaning and experimental groups

From each litter, a maximum of 3 male pups was used to compose the experimental groups, established according to the age of weaning. The regular weaning group (RW) was composed of pups weaned at PND30. RW litters were kept with the dams until PND30, when they were separated from the dams and allocated in cages in groups of 02 or 03 [27,34]. The early weaning group (EW) was composed of pups weaned at PND15 [27,34]. At PND15, EW litters were separated from the dams and kept together until PND30, when they were separated in cages in groups of 02 or 03 rats per cage. During this period (PND15–PND30) EW litters had access to crushed commercial laboratory chow in a recipient on the cage floor, and normal chow on cage dispenser, and RW litters had access to breastmilk from the dam and commercial laboratory chow available on cage dispenser. At least 03 days before the beginning of the tests, the rats were individually separated in cages.

2.3. Food intake after food deprivation

When rats were aged between PND250 and PND300, they were food deprived for a 4 h-period, between 12:00 pm and 04:00 pm, during the dark phase, while individually allocated in cages ($n = 07–08$ per group). At 04:00 pm a known amount of commercial laboratory chow was offered to the rats and at 05:00 pm the remaining amount of food on cage dispenser was measured, and the food intake was assessed through the difference between offered and remaining food.

2.4. Food intake per phase of the circadian cycle

Between PND250 and PND300, while individually located in cages, rats had their food intake in the dark and light phases measured ($n = 08–09$ per group). Food intake was measured by weighing food available on cage dispenser at 06:00 am (lights off) and 06:00 pm (lights on). The difference of chow weight between 06:00 am and 06:00 pm was considered food intake in the dark phase, as well as the difference between 06:00 pm and 06:00 am was considered food intake in the light phase. To measure the food intake during the day (24 h-period), we summed the food intake in dark and light phases.

2.5. Palatable food intake

Between PND250 and PND300, the animals ($n = 08$) were deprived of the commercial laboratory chow for 3 consecutive days between 13 h and 14 h, during which time they had access to chocolate cookies for habituation to the new food. 24 h after the last day of habituation, the animals were again deprived of the standard food at the same time, when a known amount of chocolate cookies were offered, with the food weighing at the end of the period. The difference between the food offered and the rest in the cage dispenser was considered as palatable food intake.

2.6. Body mass

Rats aged between PND250 and PND300 and individually located in cages had their body mass accessed during the dark phase and were immediately returned to their home cages ($n = 10$ per group).

2.7. mRNA expression using real-time PCR

At the dark phase, within the time interval from 04:00 pm to 05:00 pm, without food deprivation or any stimulus, rats aged between PND250 and PND300 were euthanized by decapitation ($n = 3–6$ per group). After decapitation, the skulls were immediately dissected, and the brainstem and hypothalamus were collected and stored at -20°C . The total RNA of the samples was obtained by the guanidine isothiocyanate extraction method using the TRIzol reagent. Initially the tissues were lysed using TRIzol. After 5 min incubation at room temperature, chloroform was added to the samples and then centrifuged at 10,625 g for 15 min. The aqueous phase obtained was transferred to another tube, incubated in ice-cold for 10 min and then centrifuged at 10,625 g for 10 min. The formed RNA was then washed in 75 % ethanol and centrifuged at 7378 g for 5 min. The RNA pellet was then resuspended in RNase free-water and stored. RNA quantification was performed in duplicate by diluting the samples in a ratio of 1:50 in RNase free-water. The absorbance of the samples was determined by spectrophotometry at 260 nm (corresponding to the peak of RNA uptake) and 280 nm (corresponding to the peak of protein absorption). For RNA purity analysis, the absorbance value obtained at 260 nm was divided by the value obtained at 280 nm and samples with a 260/280 ratio equal to or greater than 1.8 were used (indicative of high purity).

Real-time PCR was performed with GoTaq® 1-Step RT-qPCR System kit, (Promega, USA), following the manufacturer's recommendations. Briefly, concentrations of 900 ng of RNA, 10 μmol of primer and two units of Taq polymerase were used, with a final reaction volume of 15 μl [35]. The analyzes were performed on a Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen, USA). The sequences of primers used are shown in Table 1.

All quantifications were normalized to the housekeeping gene as an internal control ($\beta 2\text{M}$). Relative quantification of all target genes was analyzed using a comparative CT method [36].

2.8. Statistical analysis

Regular T-tests were performed to evaluate the effects of early

Table 1
Sequence of primers designed for the study of 5ht1b, 5ht2c, Sert, and the reference constitutive gene $\beta 2 M$.

Primer	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Ref.*
5ht1b	AGAAGAACTCATGGCGCT	GGGGAGCCAGCACACAATAA	NM_012765.3
5ht2c	ATTGTGCCCCGTCTGGATT	CGCGAATTGAACCGGCTATG	NM_012765.3
Sert	AGCATCTGAAAGGGGTCAA	ACACCCCTGTCTCAAGAGT	NM_013034.4
Drd1	GTTTGTGGTTTGGGTGGG	GCTCATGGTGGCTGGAAGAAAC	NM_012546
Drd2	GAGCCAACTGAAGACACCA	GCATCCATTCTCCGCTGTT	NM_012547
$\beta 2 M$	TGACCGTGATCTTCTGGTG	ACTTGAATTGGGGAGTTTCTG	NM_012512.2

* Reference number on PUBMED.

weaning, comparing EW vs. RW, by the following traits; (a) the 24 -h food intake, (b) food intake after food deprivation, (c) body mass, and (d) each mRNA expression. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc was used to evaluate the effects of the early weaning, and comparing EW vs. RW, by the following traits; (a) food intake per phase of the circadian cycle. Further, the data obtained were presented in the form of Mean $\pm$ SEM, with the results being considered significant when $p < 0.05$. Moreover, the software GraphPad Prism v6 was utilized, for carrying out the analysis.

3. Results

3.1. Early weaning increases food intake after food deprivation during later adult age in male rats

Regular *t*-test showed that EW increased food intake in male adult rats when compared to RW animals ($t = 2.283$, $df = 12,99$, $p = 0.0399$) (Fig. 1A).

3.2. Early weaning changed the feeding patterns in male adult rats

Regular *t*-test demonstrated that EW increased food intake in a 24 h - period ($t = 3.188$, $df = 15.99$, $p = 0.0057$) (Fig. 1B). ANOVA two-way showed interactions between early weaning and phases ($F_{1,30} =$

4.933, $p = 0.0340$), and isolated effect of phases ($F_{1,30} = 186.3$, $p < 0.0001$), but no effects of early weaning ($F_{1,30} = 2.989$, $p = 0.0941$). Bonferroni post-hoc test demonstrated that early weaning increased food intake only in the dark phase ($p = 0.0180$) (Fig. 1C).

3.3. Early weaning increases palatable food intake

Regular *t*-tests showed that EW promotes increase in palatable food intake ($t = 2.506$, $df = 9,405$, $p = 0.0325$) (Fig. 1D).

3.4. Early weaning does not modify the body mass of male adult rats

No differences on body mass were found between early weaning and regular weaning ($t = 1.117$, $df = 16.85$, $p = 0.2799$) (Fig. 2).

3.5. Early weaning modulated the mRNA expression of SERT and 5HT and DA receptors associated to food intake on brainstem and hypothalamus

On hypothalamus, EW increased the mRNA expression of SERT ($t = 4.185$, $df = 6$, $p = 0.0058$), and DRD1 ($t = 5.560$, $df = 10$, $p = 0.0002$), but decreased the mRNA expression of 5HT-1b ($t = 2.862$, $df = 10$, $p = 0.0169$) (Fig. 3A). Additionally, on brainstem the EW increased the mRNA expression of 5HT-1b ($t = 5.389$, $df = 6$, $p = 0.0017$), 5HT-2c ($t = 2.793$, $df = 6$, $p = 0.0014$) and SERT ($t = 3.652$,

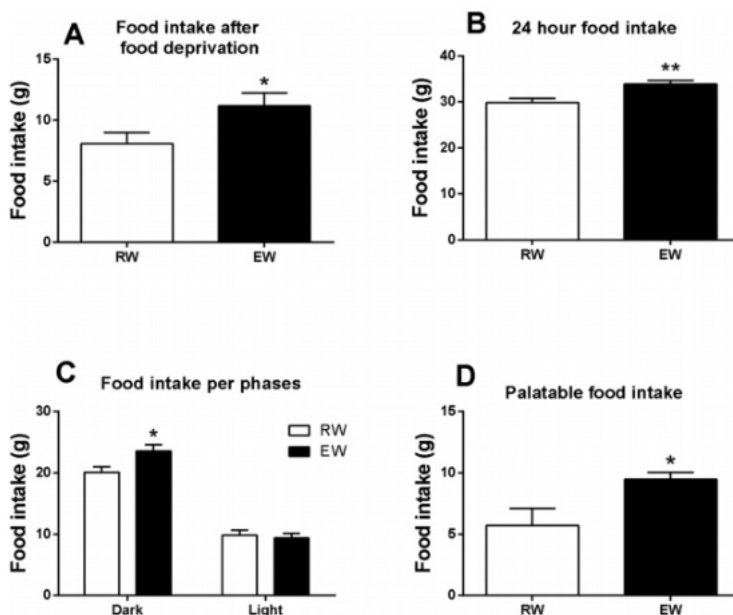


Fig. 1. The figure reveals the effects of the early weaning on the feeding patterns of male adult rats. Between PND250 and PND300, early weaned male adult rats had their food intake assessed after a 4 -h food deprivation ($n = 07 - 08$) (A) in a 24 -h cycle ($n = 08 - 09$) (B), in each phase of the circadian cycle ($n = 08 - 09$) (C), and also palatable food intake was measured ($n = 08$) (D). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (□) Regular weaning, (■) Early weaning.

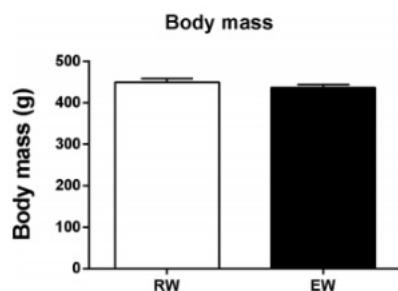


Fig. 2. The figure demonstrates the effects of early weaning on body mass of male adult rats. The body mass of early weaned male adult rats aged between PND250 and PND300 was measured ($n = 10$). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. (□) Regular weaning, (■) Early weaning.

df = 5, $p = 0.0147$), DRD1 ($t = 4.681$, df = 6, $p = 0.0034$), and DRD2 ($t = 6.520$, df = 6, $p = 0.0006$) (Fig. 3B).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study that seeks to evaluate the effects of early weaning on long-term eating behavior and neurotransmitter systems. Also, no study has sought to evaluate the effects of early weaning on hedonic eating behavior at the molecular level. Here, we observed that early weaning promoted hyperphagia with a standard diet and increased palatable food intake in adult male rats, associated with changes in mRNA expression of 5HT and DA systems components. Thus, this study provides new insights into the effects of early life stressors such as early weaning on neurobehavioral development.

When subjected to homeostatic food intake tests, the rats showed increased food intake in response to 4 h food deprivation, during the 24 h cycle, and the dark phase of the circadian cycle. Other studies using the same weaning model also point out that this stress can promote hyperphagia, a delay in the satiety point when submitted to the behavioral satiety sequence test, with a consequent increase in meal size [25]. In other study, also with the same weaning model, hyperphagia and feeding rhythm modulation were observed in the 24 h cycle in young female rats submitted to early weaning [26]. Using an early weaning model with teat bandages of dams in the last 3 days of lactation (PND17–PND20) it was also observed hyperphagia in adult male rats [37]. In another early weaning model that uses bromocriptine to inhibit lactation, no changes in food intake are observed, but several metabolic disorders are observed, such as increased body mass,

increased fat mass and leptin resistance, suggesting susceptibility to the development of obesity in these animals [15,38]. Despite the differences observed in the literature, the evidence that early weaning changes the eating behavior of rats are strong.

In addition to homeostatic modifications, changes in rats' hedonic eating behavior were also observed. When submitted to the palatable food intake test, the early weaned rats presented increased intake. Similar data were observed by Oliveira, who demonstrated that adult male rats show increased palatable food intake and preference for high-fat food [24]. Thus, we observed that early weaning alters both homeostatic and hedonic food intake, suggesting susceptibility to physiological disorders such as obesity and metabolic syndrome.

Interestingly, when body mass was assessed, no changes were observed. In the literature, no changes were observed in body mass of early weaned male rats up to PND150 [25]. However, in a study conducted with young females, it was demonstrated that the same model of early weaning used in this study is capable of promoting body mass increase [26]. These inconsistencies may be due to sexual differences, once males and females differently respond to challenges in their growth periods [39,40]. Hence, further studies are necessary to elucidate those sex differences.

Regarding the 5HT system, the data show that early weaning promoted the hypothalamic increase of SERT mRNA expression, but decreased 5HT1B mRNA expression. The 5HT system is well known to signal satiety through the action of 5HT on receptors 5HT1B, which inhibits hungry and trough receptors 5HT2C, which signals satiety [28]. In the hypothalamus, SERT acts by promoting serotonin reuptake into presynaptic terminals, whereas the 5HT1B receptor acts by stimulating satiety by inhibiting orexigenic neurons in the arcuate nucleus [28,29,41,42]. The increase in SERT along with the 5HT1B decrease seems to be related to the hyperphagia presented by the animals, since increased SERT may lead to lower serotonin availability in the synaptic clefts and the decrease of 5HT1B may impair satiety signaling. Thus, both modifications appear to act synergistically in the hypothalamus to decrease satiety signaling. In the brainstem, increased gene expression of SERT, 5HT1B and 5HT2C was observed. Tavares et al., (2019) found the same result in young female rats and suggested a mechanism for inhibiting the activity of 5HT neurons in the brainstem, where serotonin is mainly produced, specifically in the raphe nuclei [43], as SERT, 5HT1B and 5HT2C have inhibitory activity on brainstem serotonergic neurons [42,44–47]. Thus, the hypothalamus and brainstem appear to act together to decrease serotonergic activity and satiety, suggesting that early weaning programs the rats to be hyperphagic.

On the other hand, the DA system has been more associated with the control of palatable food intake, although evidence also indicates its participation in the homeostatic regulation of food intake [31,33,48,49]. Here we find increased DRD1 mRNA expression in the

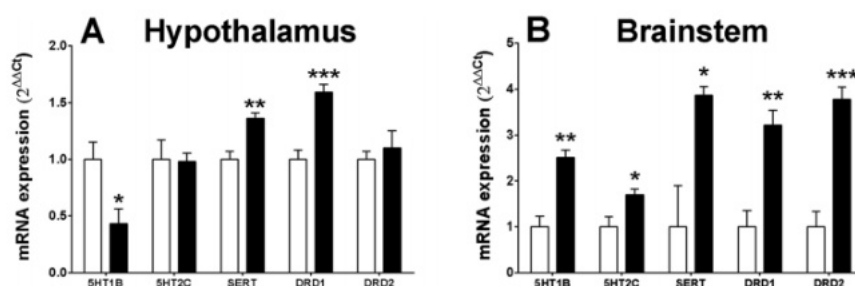


Fig. 3. The figure unveils the effects of early weaning on gene expression of 5HT and DA systems components on hypothalamus and brainstem. Rats were decapitated between 04:00 pm and 05:00 pm, in the dark phase of circadian cycle, and samples of hypothalamus and brainstem were collected ($n = 03 - 06$). Gene expression of 5HT-1b, 5HT-2c, SERT, DRD1 and DRD2 was performed in the hypothalamus (A) and brainstem (B). Data is shown as the mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (□) Regular weaning, (■) Early weaning.

hypothalamus and increased DRD1 and DRD2 mRNA expression in the brainstem. DRD1 receptors present postsynaptic action, thus being responsible for the DA signaling response [50,51]. In the hypothalamus, increased levels of this receptor have been associated with increased both standard food intake and palatable food intake in case of obesity [52,53]. The DRD2 receptor acts as a self-receptor, inhibiting DA neuron activity and consequent DA release [51]. In the midbrain, the rostral region of the brainstem, where the main bodies of the DA neurons are found, specifically in the ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra (SN), only DRD2 expression is described [54]. Increasing this receptor in this brainstem region suggests decreased activity of DA neurons. Still in the brainstem, DRD1 receptors present localization in several areas, among them the raphe nuclei, and seem to be more related to food reward signaling through circuits between the raphe nuclei and VTA and SN [33]. Studies show that abuse of reward-promoting substances is usually accompanied by a deficiency in neural signaling of this reward, which causes the individual to seek this reward incessantly [55]. Thus, the possibility of inhibition of DA neurons may be generating a compensatory mechanism, with increased expression of DRD1, in an attempt to signal reward. And it is this flaw that may be associated with the increased palatable food intake noted here, since the early weaned rats seem to need to eat more palatable food for the food reward to be recognized. This type of effect caused by perinatal insults is well described in the literature. Rodents submitted to neonatal maternal separation, perinatal malnutrition or even obesogenic diets in the perinatal period have increased palatable food intake and dopaminergic system dysfunction [8,53,56,57].

Of course, we cannot dissociate homeostatic and hedonic systems and behaviors. Today we know that both act in an integrated manner for the expression of behavior. We already know that the 5HT system, which has long been rated as a homeostasis regulator, also acts on hedonic signaling, just as the DA system that has long been rated as a food reward regulator, also acts as a regulator of homeostasis. However, despite this difficulty in associating these two systems, we note here that early weaning causes a central disorder on eating behavior that involves both 5HT and DA systems. In fact, we cannot assume these data for all individuals as a whole because the study was conducted only with males, and we know there are various sexual differences, especially regarding hormonal regulation, that could affect neurotransmission systems. In addition, some limitations of this study were the evaluation of brain regions as a whole and the lack of protein expression evaluation, since we know that changes in mRNA do not always cause changes in protein expression. Thus, further studies are needed to fill this gap. However, relevant data are presented which is consistent with behavioral data and other data already presented in the literature about the effects of early weaning on the long-term feeding behavior of rats.

5. Conclusion

Neonatal stress caused by early weaning, which consists of early and abrupt interruption of breastfeeding and maternal care, promoted changes in the eating behavior of male rats in adulthood. According to the data presented here, both homeostatic and hedonic eating behavior were sensitive to early weaning, and the 5HT and DA systems were modulated, which seems to be associated with behavioral changes. Further studies are needed to fill some gaps present in this study. However, the present study provides important data about the association of disorders during the critical periods of development with the onset of neurobehavioral disorders that can lead to problems such as obesity.

Author contributions

SS proposed the idea; GT and SS designed the study; GT, LA, FS, and VV conducted the behavioral assessments; GT, CL, and SCS conducted

the molecular assays and the partial (i.e. molecular assays) statistical analyses; GT, JS, BK and SS analyzed the data, conducted the statistical analyses, and wrote the manuscript; GT and BK edited the manuscript. All the authors agreed with the final article and declare that there is no conflict of interests.

Funding

This study was supported by the Universidade Federal de Pernambuco – UFPE and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – grant number “Universal 421752/2016-5”. Additionally, this study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and PROEX 1734-2015.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

The authors thank the Neuroplasticity and Behavior research Group. GT and FS thanks the CNPq scholarship, and LA, FS and SCS thank the CAPES scholarship.

References

- [1] P.J. Morgane, et al., The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2 (1978) 137–230.
- [2] P.J. Morgane, et al., Prenatal malnutrition and development of the brain, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (1993), [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80234-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80234-9).
- [3] P.J. Morgane, D.J. Mokler, J.R. Galler, Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26 (2002) 471–483.
- [4] T.C. Ferro Cavalcante, et al., Effects of perinatal protein malnutrition and fenfluramine action on food intake and neuronal activation in the hypothalamus and raphe nuclei of neonate rats, *Physiol. Behav.* 165 (2016) 35–42.
- [5] S. Lopes De Souza, R. Orozco-Solis, I. Grit, R. Manhães De Castro, F. Bolaños-Jiménez, Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake, *Eur. J. Neurosci.* 27 (2008) 1400–1408.
- [6] G. Pérez-García, O. Guzmán-Quevedo, R. Da Silva Aragão, F. Bolaños-Jiménez, Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21275.
- [7] A.A.M. da Silva, et al., Undernutrition during pregnancy and lactation increases the number of fos-cells in the reward system in response to a 5-HT6 receptor agonist in male adolescent rats, *Int. J. Food Sci. Nutr.* (2017) 1–6, <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1382455>.
- [8] J.A. de Souza, et al., Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males, *Appetite* 123 (2018) 114–119.
- [9] O. Resnick, et al., Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (1979), [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(79\)90011-3](https://doi.org/10.1016/0149-7634(79)90011-3).
- [10] J.L. Smart, J. Dobbing, Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat, *Brain Res.* 28 (1971) 85–95.
- [11] T.F. Massaro, D.A. Levitsky, R.H. Barnes, Protein malnutrition induced during gestation: its effect on pup development and maternal behavior, *Dev. Psychobiol.* 10 (1977) 339–345.
- [12] R. Orozco-Solis, et al., Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding, *Physiol. Behav.* 96 (2009) 481–492.
- [13] L. Paternain, et al., Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats, *Dis. Models Mech.* 697 (2012) 691–697, <https://doi.org/10.1242/dmm.009043>.
- [14] T. de Almeida Magalhães, D. Correia, L.M. de Carvalho, S. Damasceno, A.L. Brunialti Godard, Maternal separation affects expression of stress response genes and increases vulnerability to ethanol consumption, *Brain Behav.* (2018), <https://doi.org/10.1002/brb3.841>.
- [15] V. Younes-Rapozo, et al., Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring, *Br. J. Nutr.* 113 (2015) 536–545.
- [16] S.Y. Shin, S.H. Han, R.S. Woo, S.H. Jang, S.S. Min, Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation, *Neuroscience* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.041>.
- [17] M.M. Odeon, L. Yamauchi, M. Grosman, G.B. Acosta, Long-term effects of repeated maternal separation and ethanol intake on HPA axis responsiveness in adult rats,

- Brain Res. (2017), <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.034>.
- [18] S. Iwasaki, K. Inoue, N. Kirikake, K. Hikiji, Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life, *Physiol. Behav.* 70 (2000) 1–4.
 - [19] C.C. Michaels, S.G. Holtzman, Neonatal stress and litter composition alter sucrose intake in both rat dam and offspring, *Physiol. Behav.* 89 (2006) 735–741.
 - [20] M. Shimozuru, et al., Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of wistar rats, *Dev. Psychobiol.* 49 (2007) 343–350.
 - [21] K. Kanari, T. Kikusui, Y. Takeuchi, Y. Mori, Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats, *Behav. Brain Res.* 156 (2005) 45–52.
 - [22] A. Ito, T. Kikusui, Y. Takeuchi, Y. Mori, Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats, *Behav. Brain Res.* 171 (2006) 87–93.
 - [23] K. Nakamura, T. Kikusui, Y. Takeuchi, Y. Mori, The influence of early weaning on aggressive behavior in mice, *J. Vet. Med. Sci.* 65 (2003) 1347–1349.
 - [24] L. dos Santos Oliveira, et al., Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood, *Behav. Processes* 86 (2011) 75–80.
 - [25] S. Oliveira, et al., Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats, *Behav. Processes* 86 (2011) 119–124.
 - [26] G.A. Tavares, et al., Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations, *Behav. Processes* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.103981>.
 - [27] V. Nováková, J. Faltin, V. Flandera, P. Hahn, O. Kodolovský, Effect of early and late weaning on learning in adult rats, *Nature* 193 (1962) 280.
 - [28] L.K. Heisler, et al., Serotonin Reciprocally Regulates Melanocortin Neurons to Modulate Food Intake, *Neuron* (2006), <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.004>.
 - [29] A.S. Garfield, L.K. Heisler, Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity, *J. Physiol.* 587 (2009) 49–60.
 - [30] J.P. Voigt, H. Fink, Serotonin controlling feeding and satiety, *Behav. Brain Res.* 277 (2015) 14–31.
 - [31] S. Frank, et al., Dopamine depletion reduces food-related reward activity independent of BMI, *Neuropsychopharmacology* (2016), <https://doi.org/10.1038/npp.2015.313>.
 - [32] N.D. Volkow, G.J. Wang, R.D. Baler, Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity, *Trends Cogn. Sci.* (2011), <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>.
 - [33] R. Wise, Brain dopamine and reward, *Annu. Rev. Psychol.* (1989), <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.40.1.191>.
 - [34] T. Kikusui, Y. Mori, Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents, *J. Neuroendocrinol.* 21 (2009) 427–431.
 - [35] T.L.A. Silva, et al., Serotonin transporter inhibition during neonatal period induces sex-dependent effects on mitochondrial bioenergetics in the rat brainstem, *Eur. J. Neurosci.* (2018) 0–1, <https://doi.org/10.1111/ejn.13971>.
 - [36] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
 - [37] J.G. Franco, et al., Resveratrol prevents hyperleptinemia and central leptin resistance in adult rats programmed by early weaning, *Horm. Metab. Res.* (2014), <https://doi.org/10.1055/s-0034-1375688>.
 - [38] V. Younes-Rapozo, et al., Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood, *Br. J. Nutr.* 108 (2012) 2286–2295.
 - [39] G.J. Howie, D.M. Sloboda, M.H. Vickers, Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring, *Br. J. Nutr.* (2012), <https://doi.org/10.1017/S000711451100554X>.
 - [40] M.A. Rol De Lama, A. Pérez-Romero, J.A.F. Tresguerres, M. Hermanussen, C. Ariznavarreta, Recombinant human growth hormone enhances tibial growth in peripubertal female rats but not in males, *Eur. J. Endocrinol.* (2000), <https://doi.org/10.1530/eje.0.1420517>.
 - [41] R.B. Rothman, M.H. Baumann, Serotonin releasing agents: neurochemical, therapeutic and adverse effects, *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2002), [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00669-4](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00669-4).
 - [42] L. MacGillivray, L.M. Lagrou, K.B. Reynolds, P.J. Rosebush, M.F. Mazurek, Role of serotonin transporter inhibition in the regulation of tryptophan hydroxylase in brainstem raphe nuclei: time course and regional specificity, *Neuroscience* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.055>.
 - [43] J.P. Hornung, The human raphe nuclei and the serotonergic system, *J. Chem. Neuroanat.* 26 (2003) 331–343.
 - [44] J. Serrats, G. Mengod, R. Cortés, Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei, *J. Chem. Neuroanat.* 29 (2005) 83–91.
 - [45] L. Boothman, J. Raley, F. Denk, E. Hirani, T. Sharp, In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism, *Br. J. Pharmacol.* 149 (2006) 861–869.
 - [46] K. Spoida, O.A. Massek, E.S. Deneris, S. Herlitze, Gq/5-HT_{2C} receptor signals activate a local GABAergic inhibitory feedback circuit to modulate serotonergic firing and anxiety in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014), <https://doi.org/10.1073/pnas.1321576111>.
 - [47] C.E. Hagan, R.A. McDevitt, Y. Liu, A.R. Puray, J.F. Neumaier, 5-HT_{1B} autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes, *Synapse* 66 (2012) 1024–1034.
 - [48] H. Ikeda, N. Yonemochi, C. Ardianto, L. Yang, J. Kamei, Pregabalin increases food intake through dopaminergic systems in the hypothalamus, *Brain Res.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.09.026>.
 - [49] M.M. Meguid, et al., Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake, *Nutrition* (2000), [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00449-4).
 - [50] M. Jaber, S.W. Robinson, C. Missale, M.G. Caron, Dopamine receptors and brain function, *Neuropharmacology* (1996), [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(96\)00100-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(96)00100-1).
 - [51] D. Vallone, R. Picetti, E. Borrelli, Structure and function of dopamine receptors, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2000), [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00063-9).
 - [52] Z. Mirmohammadsadeghi, M. Shareghi Brojeni, A. Haghighparast, A. Eliassi, Role of paraventricular hypothalamic dopaminergic D₁ receptors in food intake regulation of food-deprived rats, *Eur. J. Pharmacol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.028>.
 - [53] S.O. Fetissov, M.M. Meguid, T. Sato, L.H. Zhang, Expression of dopaminergic receptors in the hypothalamus of lean and obese Zucker rats and food intake, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* (2002), <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00092.2002>.
 - [54] J.H. Meador-Woodruff, A.A.E. Mansour, Bennett Award paper, Expression of the dopamine D₂ receptor gene in brain, *Biol. Psychiatry* (1991).
 - [55] G.F. Koob, Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder, *Front. Psychiatry* (2013), <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00072>.
 - [56] M. Reynaert, et al., Hedonic Sensitivity to Natural Rewards is Affected by Prenatal Stress in a Sex-dependent Manner, (2015), <https://doi.org/10.1111/adb.12270>.
 - [57] M.B. Alves, R. Dalle Molle, M. Desai, M.G. Ross, P.P. Silveira, Increased palatable food intake and response to food cues in intrauterine growth-restricted rats are related to tyrosine hydroxylase content in the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens, *Behav. Brain Res.* 287 (2015) 73–81.

APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO “EARLY LIFE STRESS AND THE ONSET OF OBESITY: PROOF OF MICRORNAS’ INVOLVEMENT THROUGH MODULATION OF SEROTONIN AND DOPAMINE SYSTEMS’ HOMEOSTASIS”.



MINI REVIEW
published: 28 July 2020
doi: 10.3389/fphys.2020.00925



Early Life Stress and the Onset of Obesity: Proof of MicroRNAs’ Involvement Through Modulation of Serotonin and Dopamine Systems’ Homeostasis

Gabriel Araujo Tavares^{1,2*}, Amada Torres^{1,3} and Juliette Araujo de Souza⁴

¹ Nantes Université, INRAE, UMR 1280, PhAN, Nantes, France, ² Laboratory of Neuroplasticity and Behavior, Graduate Program of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, ³ Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México – Campus Morelos, Cuernavaca, Mexico, ⁴ Laboratory of Neuroplasticity and Behavior, Graduate Program of Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Healthy persons hold a very complex system for controlling energy homeostasis. The system functions on the interconnected way between the nutritional, endocrine, neural, and epigenetic regulation, which includes the microRNAs (miRNAs). Currently, it is well accepted that experiences of early life stress (ELS) carry modification of the central control of feeding behavior, one of the factors controlling energy homeostasis. Recently, studies give us a clue on the modulation of eating behavior, which is one of the main factors associated with the development of obesity. This clue connected the neural control through the serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems with the fine regulation of miRNAs. The first pieces of evidence highlight the presence of the miR-16 in the regulation of the serotonin transporter (SERT) as well as the receptors 1a (5HT1A) and 2a (5HT2A). On the other hand, miR-504 is related to the dopamine receptor D2 (DRD2). As our knowledge advance, we expected to discover other important pathways for the regulation of the energy homeostasis. As both neurotransmission systems and miRNAs seem to be sensible to ELS, the aim of this review is to bring new insight about the involvement of miRNAs with a central role in the control of eating behavior focusing on the influences of ELS and regulation of neurotransmission systems.

Keywords: miRNA, early life stress, obesity, serotonin, dopamine

Abbreviations: 3’UTR, 3’Untranslated region; 5HT, 5-Hydroxytryptamine, serotonin system; 5HT1A, 5-Hydroxytryptamine receptor 1A; 5HT1B, 5-Hydroxytryptamine receptor 1B; 5HT2C, 5-Hydroxytryptamine receptor 2C; 5HT4, 5-Hydroxytryptamine receptor 4; 5HT6, 5-Hydroxytryptamine receptor 6; 5HT7, 5-Hydroxytryptamine receptor 7; AgRP, protein related to gene agouti; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CART, cocaine and amphetamine-related transcript; CpGs, methylated cytosines follow of guanine nucleotide sites; CUMS, chronic unpredictable mild-life stress; CUS, chronic unpredictable stress; DA, dopamine, dopamine system; DAT, solute carrier family 6, neurotransmitter transporter dopamine member 3, SLC6A3; Dicer, microRNA-processing ribonuclease III; DRD1, dopamine receptor D1; DRD2, dopamine receptor D2; DRD3, dopamine receptor D3; DRD5, dopamine receptor D5; ELS, early life stress; EW, early weaning; has-mir-16, MI0000070, MI0000115; Let-7d, hsa-let-7d-5p, mmu-let-7d-5p, rno-let-7d-5p (MIMAT0000065, MIMAT0000383, MIMAT0000562); miR-103, has-mir-103a-1 MI0000109, has-mir-103a-2 MI0000108; miR-143-3p, hsa-miR-143-3p, mmu-miR-143-3p, rno-miR-143-3p (MIMAT0000435, MIMAT0000247, MIMAT0000849); miR-16-5p, hsa-miR-16-5p, mmu-miR-16-5p, rno-miR-16-5p (MIMAT0000069, MIMAT0000527, MIMAT0000785); miR-200a, rno-miR-200a-3p, mmu-miR-200a-3p, hsa-miR-200a-3p (MIMAT0000682, MIMAT0000519, MIMAT0000874); miR-96, hsa-miR-96-5p, mmu-miR-96-5p, rno-miR-96-5p (MIMAT0000095, MIMAT0000541, MIMAT0000818); miRNAs, microRNAs; mmi-miR-135, MI0000161, MI0000715; mPFC, medial pre-frontal cortex; mRNA, Messenger RNA; MS, maternal separation; NAcc, nucleus accumbens; NPY, neuropeptide Y; PLC, prelimbic cortex; PND, postnatal day; POMC, pro-opiomelanocortin; REST, repressor element-1 silencing transcription factor; RNAs, ribonucleic acids; SERT, solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4/5HTT), serotonin transporter; TH, tyrosine hydroxylase.

OPEN ACCESS

Edited by:

Hanna Taipaleenmäki,
University Medical Center
Hamburg-Eppendorf, Germany

Reviewed by:

Stefano Bastianini,
University of Bologna, Italy
Yuval Silberman,
Pennsylvania State University,
United States

*Correspondence:

Gabriel Araujo Tavares
gabrieltavaresulpe@outlook.com

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 22 May 2020

Accepted: 09 July 2020

Published: 28 July 2020

Citation:

Tavares GA, Torres A and
de Souza JA (2020) Early Life Stress
and the Onset of Obesity: Proof
of MicroRNAs’ Involvement Through
Modulation of Serotonin
and Dopamine Systems’
Homeostasis. *Front. Physiol.* 11:925.
doi: 10.3389/fphys.2020.00925

INTRODUCTION

Almost over one-third of the world's population is overweight or obese (Chooi et al., 2019). This condition negatively affects the life quality, productivity, and costs with public health. One of the main aspects of this body weight regulation is feeding behavior (Remmers and Delemarre-van de Waal, 2011) which involves neural networks such as the serotonergic (5HT) and dopaminergic (DA) systems (Meguid et al., 2000). Several studies show that the disruption of those systems is strongly associated with increased food intake and/or preference for palatable food, which are important factors contributing for the onset of obesity (van Galen et al., 2018). Gene expression of both 5HT and DA systems can be influenced by miRNAs (Launay et al., 2011; Shi et al., 2014), and in this case, they would be the key regulatory molecules in the comprehension of the pathophysiology of the feeding behavior.

MiRNAs are small non-coding RNAs with an average length of approximately 22 nucleotides (Bartel, 2004). They regulate post-transcriptional gene expression by binding to the 3'UTR of mRNAs, some miRNAs also regulate the expression of another or several other miRNAs (Truscott et al., 2016), and even themselves (Zisoulis et al., 2012). Generally, miRNA specifically inhibit protein synthesis either by repressing translation or by inducing deadenylation and degradation of target mRNA (Bartel, 2004) but were also reported to activate translation (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Each miRNA has the capacity to target hundreds of diverse transcripts, and a single messenger can be modulated by several miRNAs, this represents a highly coordinated system and fine-tuned regulation of protein expression (Krol et al., 2010; O'Carroll and Schaefer, 2013).

On the other hand, a healthy environment during the beginning of life is crucial for a proper development in mammals (Resnick et al., 1979; Morgane et al., 1993, 2002). Maternal nutritional and emotional factors are critical during periconceptional and perinatal periods (Morgane et al., 1993; Chen and Baram, 2016). Early life stress (ELS) experiences can lead to long-term neurobehavioral complications. Both pre-clinical and clinical studies identify the influence of ELS on the development of several psychiatric disorders, including perturbation of feeding behavior, eating disorders and obesity (Chen and Baram, 2016; Entringer et al., 2016). Interestingly, the miRNAs are also sensible to ELS through several models, as showed on **Table 1**. In this context, this review brings a potential role of the miRNAs in the onset of obesity through modulation of 5HT and DA in response to ELS.

SEROTONIN: ROLE ON FEEDING BEHAVIOR, INFLUENCES OF ELS, AND MIRNA REGULATION

The 5HT system includes receptors, transporters and enzymes involved in the metabolism of serotonin (5-Hydroxytryptamine), and it regulates several functions in the organism as locomotors activity, body temperature, wake-sleep cycle, and feeding

behavior (Lam et al., 2010; Olivier, 2015). Regarding the control of eating behavior, serotonin has a well-established anorectic role through promotion of satiety. In the arcuate nucleus of the hypothalamus, serotonin acts in different ways; it acts on 5HT1B, promoting inhibition of neurons that produce neuropeptide Y (NPY) and the cocaine and amphetamine-related transcript (CART), which are orexigenic. It also acts on 5HT2C, promoting activation of neurons that produce pro-opiomelanocortin (POMC) and the peptide related to the agouti gene (AgRP), which are anorexigenic, thus promoting satiety signaling (Heisler et al., 2006). In addition, recent studies also refer that serotonin has a role in the hedonic regulation of eating behavior. Receptors such as 5HT6 in areas of the mesocorticolimbic circuit have been associated with motivational feeding behavior (da Silva et al., 2017). The impairments of the homeostasis of the serotonergic system are associated with disorders of eating behavior, usually associated with increased food intake, either by homeostatic or hedonic changes. In particular, the serotonergic system appears extremely sensitive to environmental changes during the development of the organism, and several studies have shown that ELS impairs the function of the 5HT system (de Lima et al., 2020).

Models of ELS in animals are usually associated with deprivation of the mother-infant relationship, such as in maternal separation (MS) and early weaning (EW) models (Kikusui and Mori, 2009; Harrison and Baune, 2014). Previous studies from our laboratory show that the MS disrupts the 5HT system. In middle aged females, it increases the 5HT1B gene expression in the hypothalamus, associated with decreased food intake (de Souza et al., 2020a), and in adult males, we observed a decreased action of fluoxetine on food intake (de Souza et al., 2020b). In addition, MS promotes decreased 5HT concentration in hypothalamus and amygdala of young animals, associated with increased palatable food intake (de Lima et al., 2020). Together, these data suggest that MS alter the serotonergic system function, contributing to disorders of feeding behavior. On the other hand, we have been able to associate the EW with changes in gene expression of several components of the 5HT system in male and female rats, such as SERT, 5HT1B, and 5HT2C in hypothalamus and brainstem. Based on the patterns of expression in the brainstem and response to fenfluramine, we suggested a hypofunction of the serotonergic system in the EW animals (Tavares et al., 2019, 2020a,b). All these changes in the 5-HT system were accompanied by alterations on feeding behavior, which indicate that the 5HT system control of feeding behavior can be modulated by ELS, which can be directly linked to the onset of obesity.

Recently, studies have deepened about these compensatory changes and epigenetic modifications have been extensively investigated. In this respect, miRNAs have been shown to be important regulators y/o mediators of gene expression. In the case of depression, it is currently accepted that several miRNAs modulate the activity of the serotonergic system, but little is known about these regulators in the context of eating behavior. As far as we know, miR-16 is able to bind the SERT messenger

TABLE 1 | Influences of ELS on miRNA activity.

ELS model	Subjects	Region	Outcome	Authors
Pre-clinical studies				
MS	Rat	Hippocampus	Increased miR-16	Bai et al., 2012
MS	Mice	Cortical neurons	Impaired response of miR-212 to the learning process on a cocaine conditioned place preference test	Viola et al., 2016
MS + CUS	Rat	NAcc	Increased miR-504	Zhang et al., 2013
MS	Rat	mPFC	Increased REST4	Uchida et al., 2010
Morphine + Apnea + MS	Mice	Hippocampus	Decreased miR-204-5p, miR-455-3p, miR-448-5p, and miR-574-3p	McAdams et al., 2015
CUMS	Rat	Basolateral amygdala	Increased rno-miR-124a	Xu et al., 2017
Increased maternal care	Rat	Hypothalamus	increased rno-miR-488, rno-miR-144, and rno-miR-542-5p and decreased rno-miR-421 and rno-miR-376b-5p	Vogel Ciernia et al., 2018
Protein malnutrition	Mice	Hypothalamus	increased mmu-miR-187-3p, mmu-miR-369-3p and mmu-miR-132-3p	Berardino et al., 2019
Unpredictable maternal separation combined with maternal stress	Mice	Sperm	Changes in miRNA transmitted to F2 generation	Gapp et al., 2014
Prenatal stress	Rat	Hippocampus	Decreased hsa-miR-125b-1-3p	Cattane et al., 2019
Clinical studies				
Childhood maltreatment	both sexes	Leukocytes	Methylation changes in CpGs close to region coding miR-124-3	Prados et al., 2015
Childhood abuse	Men aged 45 years old	Whole blood	Methylation changes in promoter region of 39 miRNAs	Suderman et al., 2014
Child abuse	European adults of both sexes	Buccal mucosa cells	Association between the polymorphism rs3125 of 5HT2A and brooding. This region is predicted to be targeted by miR-1270, miR-1304, miR-202, miR-539 and miR-620	Eszlari et al., 2019
Childhood trauma	Adult of both sexes	Blood cells	Decreased hsa-miR-125b-1-3p	Cattane et al., 2019
Childhood trauma	Adult both sexes	Human hippocampus progenitor cells	Decreased hsa-miR-125b-1-3p	Cattane et al., 2019

ELS, early life stress; MS, maternal separation; CUS, chronic unpredictable stress; CUMS, chronic unpredictable mild-life stress; NAcc, nucleus accumbens; mPFC, medial pre-frontal cortex; CpGs, methylated cytosines followed by guanine nucleotide sites.

(Table 2) and silence its expression in humans and animals (Baudry et al., 2010; Moya et al., 2013; Song et al., 2015; Shao et al., 2018). The relationship between miR-16 and SERT is even modulated by pharmacological antidepressant treatment and also alternative treatments as the electroacupuncture; besides different responses according to the affected brain area, these treatments improve the level of depressive behaviors, suggesting a highly specific regulation (Baudry et al., 2010; Zhao et al., 2019). SERT appears to be a key piece of regulation, as different miRNAs can modify its expression, as the mmu-miR-135 (Issler et al., 2014), rno-miR-18a-5p, rno-miR-34a-5p, rno-miR-135a-5p, rno-miR-195-5p, rno-miR-320-3p, rno-miR-674-3p, and rno-miR-872-5p (Zurawek et al., 2017). This relationship between miR-16 and SERT is interesting, since SERT activity is directly related to serotonergic signaling. SERT recaptures the remaining amount of serotonin from the synaptic clefts, and an increase in its activity may mean a decrease in serotonergic signaling. In depression, has been shown that decreased levels of miR-16 and elevated levels of SERT are associated with the pathology by promoting a reduction in serotonergic signaling. Drugs that block SERT activity and increase serotonin levels are used to

treat this depressive behavior. Interestingly, the same drugs are used to treat obesity (Halford et al., 2012) as they also promote a reduction in food intake. This evidence gives a primary role to miR-16 that may also be a candidate to modulate SERT activity in the context of eating disorders.

In addition to SERT, miRNAs modulate the activity of other components of the serotonergic system (Table 2), such as 5HT1B, 5HT1A, 5HT4, 5HT2C, and 5HT7. The 5HT1B receptor is advised as a target of the miR-96 (Jensen et al., 2009). 5HT1A seems to be targeted by miR-16, miR-135 (Liu et al., 2017), and has-miR-26a-2 (Xie et al., 2019). The 5HT4 receptor acquire decreased expression in response to miR-103, has-miR-15b and a mix containing hsa-miR-103, has-miR-15b and hsa-miR-16 (Wohlfarth et al., 2017). In addition, miR-34 appears to bind the receptor 5HT2C (Andolina et al., 2016), hsa-miR-16 appears to reduce 5HT2A expression (Yang et al., 2017), and miR-29a decreases the expression of 5HT7 (Volpicelli et al., 2019). The impairment of the activity of these receptors is associated with disrupted food intake either by homeostatic or hedonic mechanisms. 5HT1A, 5HT1B, and 5HT2C are strongly associated with satiety signaling, and several studies report that their

TABLE 2 | Components of the serotonergic and dopaminergic systems and their regulatory-associated miRNAs.

Components	miRNAs	Authors
Serotonin or 5-Hydroxytryptamine (5HT) system		
SERT (SLC6A4/5HTT)	miR-16, miR-135, miR-18a-5p, miR-34a-5p, miR-135a-5p, miR-195-5p, miR-320-3p, miR-674-3p, and miR-872-5p.	Baudry et al., 2010; Launay et al., 2011; Moya et al., 2013; Issler et al., 2014; Song et al., 2015; Zurawek et al., 2017; Shao et al., 2018; Zhao et al., 2019
5HT1A	miR-16, miR-135, and miR-26a-2.	Liu et al., 2017; Xie et al., 2019
5HT1B	miR-96	Jensen et al., 2009
5HT2A	miR-16	Yang et al., 2017
5HT2C	miR-34	Andolina et al., 2016
5HT4	miR-103, miR-15b, and a mix containing miR-103, miR-15b, and miR-16	Wohlfarth et al., 2017
5HT7	miR-29a	Volpicelli et al., 2019
Dopamine (DA) system		
DRD1	miR-504, miR-105, miR-15a, miR-15b, miR-16 and miR-142-3p	Tobón et al., 2012, 2015; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2017; Wu et al., 2020
DRD2	miR-143, miR-200a, miR-504, has-miR-9 and miR-326	Zhang et al., 2013, 2015; Shi et al., 2014; Gangisetty et al., 2017; Wu et al., 2018; Mavrikaki et al., 2019; Wang et al., 2019
DRD3	let-7d	Bahi and Dreyer, 2018
DAT	miR-137 and miR-491	Jia et al., 2016

SERT, solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4/5HTT), serotonin transporter; 5HT1A, 5-Hydroxytryptamine receptor 1A; 5HT1B, 5-Hydroxytryptamine receptor 1B; 5HT2C, 5-Hydroxytryptamine receptor 2C; 5HT4, 5-Hydroxytryptamine receptor 4; 5HT7, 5-Hydroxytryptamine receptor 7; DRD1, dopamine receptor D1; DRD2, dopamine receptor D2; DRD3, dopamine receptor D3; DAT, dopamine transporter, solute carrier family 6 member 3 (SLC6A3).

disruption promotes increased food intake. On the other hand, 5HT4 is associated with hedonic modulation of food intake and obesity. Thus, the modulation of these receptors through miRNAs can also be associated with the onset of eating disorders leading to obesity.

DOPAMINE: ROLE ON FEEDING BEHAVIOR, INFLUENCES OF ELS, AND MIRNA REGULATION

The dopaminergic system, as well as the serotonergic system, comprises a set of neurotransmitter, enzymes, receptors, and dopamine transporter (DAT). On the other hand, neurons that synthesize dopamine can be found in the brainstem and can be divided into three groups, which forms the Nigro Striatal system, the mesocorticolimbic system, and the mesocortical system (Ogawa and Watabe-Uchida, 2018). The principal role on feeding behavior is taken by the mesocorticolimbic system (Wise, 1989; Berridge and Kringelbach, 2008). Dopaminergic neurons are known to be involved in emotion-based behavior

including motivation and reward (Phillips et al., 2008). Therefore, in the context of the feeding behavior, this system is mainly related to the hedonic component of feeding, but evidences also point out that dopamine is a key component on hypothalamic regulation of the homeostatic eating behavior (Meguid et al., 2000; Ikeda et al., 2018).

The DA system is sensible to ELS and its disruption is associated with several psychiatric disorders, such as eating disorders and obesity (Naef et al., 2015). Our previous study showed that DRD1 and DRD2 gene expression were increased in the brainstem of adult rats, accompanied by higher palatable food intake after MS (de Souza et al., 2018). The MS also modulates the DA system in other brain areas, such as PLC, NAcc, and striatum, changing the density of immunoreactive fibers of TH, and the mRNA expression of DRD2, DRD1, and DRD5 (Majcher-Maślanka et al., 2017). On the other hand, EW increases DRD1 mRNA expression in the hypothalamus and brainstem and DRD2 in the brainstem of middle-aged male rats (Tavares et al., 2020b). In all of these studies, disrupted patterns on feeding behavior are observed, indicating that alterations in the dopaminergic system can be one of the underlying mechanisms that lead to behavioral disorders.

Increased evidence points out that several components of the dopaminergic system are influenced by some miRNAs (Table 2). DRD1 appears to be regulated by miR-504 (Zhang et al., 2013), rno-miR-105 (Zhao et al., 2017), and for the cluster of hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, and hsa-miR-16-5p, and mmu-miR-142-3p (Tobón et al., 2012, 2015). The expression of the DRD2 is modified by miR-143-3p (Wang et al., 2019), miR-200a (Wu et al., 2018), miR-504 (Zhang et al., 2013), hsa-miR-9, and hsa-miR-326 (Shi et al., 2014; Zhang et al., 2015; Gangisetty et al., 2017; Mavrikaki et al., 2019). Both receptors, DRD1 and DRD2, are associated with control of food intake, either homeostatic or hedonic, in several areas of the brain (Wise, 1989; Ikeda et al., 2018) which indicates that its modulation through miRNAs can modulate the food intake. In addition, overexpression of let-7d is negatively correlated with the expression of DRD3 in the hippocampus of mice (Bahi and Dreyer, 2018). The activity of the DRD3 is controversy in the context of food intake, but some evidences associate it with eating disorders and decreased food intake (Thomsen et al., 2017; González et al., 2019). The expression of DAT, the major controller of dopamine levels in the synaptic clefts, is post-transcriptionally regulated on cell culture of dopaminergic neurons by miR-137 and miR-491 (Jia et al., 2016). This transporter acts like SERT, reuptaking the dopamine from the synaptic cleft, so its function is extremely necessary to normal DA signalization, even in the context of eating behavior. On the other hand, the reduction of Dicer, a miRNA-processing ribonuclease III, in the ventral midbrain of DA neurons promotes changes in the miRNAs profile and altered the survival capacity of these dopaminergic neurons (Chmielarz et al., 2017). Together, these evidences extended the susceptibility of the DA system to the regulation of miRNAs, which can lead to modulation of eating behavior and may be associated with eating disorders.

PERSPECTIVES: ROLE OF THE MIRNAS ON THE ONSET OF OBESITY THROUGH 5HT AND DA SYSTEMS' DISRUPTION IN THE CONTEXT OF ELS

In addition to knowing that components of the 5HT and DA neurotransmission systems are susceptible to ELS, some evidence also shows that miRNAs have their expression and activity influenced by ELS, which is summarized in **Table 1**. Both, pre-clinical and clinical studies affirm that childhood trauma could be associated with the modulation of miRNA, as the case of the miR-16 and miR-504 which have their control of the serotonin and dopamine impaired by stress, with consequences such as depression, anhedonia, and body weight gain. However, more studies are needed to understand the full picture, specifically in the context of the control of the feeding behavior, which is directly involved in the development of obesity.

Conversely, both clinical and pre-clinical studies demonstrate that ELS is able to alter SERT activity (Wankerl et al., 2014; Van Der Knaap et al., 2015; Tavares et al., 2019, 2020a). Interestingly, differences in SERT activity are observed in obesity, both in humans and animals (Giannaccini et al., 2013; Borgers et al., 2014; Zha et al., 2017). For example, the density of SERT is reduced in obese humans (Giannaccini et al., 2013; Borgers et al., 2014) and increased in rats with abdominal obesity who were exposed to a diet rich in simple carbohydrates (Spadaro et al., 2015). In addition to being involved in the pathophysiology of obesity and being sensitive to ELS, several lines of evidence in the literature show that SERT is a target for miR-16 and propose an important role in regulating its activity (Baudry et al., 2010). On the other hand, animal studies demonstrate that the 5HT_{1A} receptor is also modulated by ELS (Bravo et al., 2014; Razoux et al., 2017) and has increased density in the hippocampus and hypothalamus of rats chronically submitted to a Westernized diet (Yu et al., 2018). Interestingly, 5HT_{1A} is also the target of miR-16, which has its expression modulated by ELS (Bai et al., 2012). The receptor 5HT_{2A} is, as well, modulated by ELS in animals and humans (Rentesi et al., 2013; Parade et al., 2017) and involved with the pathophysiology of obesity (Rosmond et al., 2002; Huang et al., 2004). Interestingly, the 5HT_{2A} is also targeted by the miR-16 (Yang et al., 2017). From these observations, we believe that miR-16 is an excellent candidate for moderating changes in SERT, 5HT_{1A}, and 5HT_{2A} due to ELS, in the context of the altered eating behavior.

Regarding the dopaminergic system, the DRD1 and DRD2 actively participate in the regulation of food intake, especially with regard to palatable foods, as these are related to the food reward system (Meguid et al., 2000; Berridge et al., 2009; Volkow et al., 2011). Changes in this reward system are linked to eating behavior disorders, with changes in the activity of DRD1 and DRD2 being observed in humans and animals (Guo et al., 2014; Rivera et al., 2015; Gaiser et al., 2016; de Souza et al., 2018; Romanova et al., 2018; Tavares et al., 2020b). In addition, both

receptors are modulated by ELS (de Souza et al., 2018; Tavares et al., 2020b). Interestingly, we observed that miR-504 targets both DRD1 and DRD2, with their expression being altered by ELS (Zhang et al., 2015). Additionally, DRD1 has also been identified as a target for miR-16 (Wu et al., 2020). Thus, we believe that miR-504 and miR-16 modulate DRD1 and DRD2, in the context of eating disorders associated with ELS.

In summary, according to the evidence reported, we can infer that the serotonergic and dopaminergic systems undergo regulation of their activity through post-transcriptional modulation by miRNAs. Both systems participate in the physiological and pathological processes of eating behavior, which leads us to believe that miRNAs may be behind several changes in eating behavior as observed in several disorders such as obesity. Several studies point out that the genesis of these disorders is largely associated with experiences of stress early in life. Neonatal stress is already well described as a modulator of the serotonergic and dopaminergic systems associated with disorders of eating behavior, as well as a modulator of expression and activity of miRNAs. In addition, we know that miRNAs participate in the pathological processes of several psychiatric disorders. Thus, we establish here a relationship between neonatal stress and the modulation of the serotonergic and dopaminergic systems, through post-transcriptional regulation by miRNAs, as a possible pathophysiological mechanism behind eating behavior disorders. Future studies are needed to investigate this relationship and provide further support for the scientific community in the search for understanding and treatment of pathologies of eating behavior.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was carried out with the financial support of the regional program "RFI Food for Tomorrow/Cap Aliment and Research, Education, and Innovation in Pays de la Loire," which was supported by the French Region Pays de la Loire, the European Regional Development Fund (FEDER). Additionally, this study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)* – Finance Code 001.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Rudah Goes and Tayná Goes for helping with the design of the graphical abstract and Dr. Bertrand Kaeffer for the comments to the manuscript.

REFERENCES

- Andolina, D., Di Segni, M., Bisicchia, E., D'Alessandro, F., Cestari, V., Ventura, A., et al. (2016). Effects of lack of microRNA-34 on the neural circuitry underlying the stress response and anxiety. *Neuropharmacology* 107, 305–316. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.044
- Bahi, A., and Dreyer, J. L. (2018). Lentiviral-mediated let-7d microRNA overexpression induced anxiolytic- and anti-depressant-like behaviors and impaired dopamine D3 receptor expression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 28, 1394–1404. doi: 10.1016/j.euroneuro.2018.09.004
- Bai, M., Zhu, X., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, L., Xue, L., et al. (2012). Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life. *PLoS One* 7:e46921. doi: 10.1371/journal.pone.0046921
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J. M., and Kellermann, O. (2010). MiR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* 329, 1537–1541. doi: 10.1126/science.1193692
- Berardino, B. G., Chertoff, M., Gianatiempo, O., Alberca, C. D., Prieguer, R., Fiszein, A., et al. (2019). Exposure to enriched environment rescues anxiety-like behavior and miRNA deregulated expression induced by perinatal malnutrition while altering oligodendrocyte morphology. *Neuroscience* 408, 115–134. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.03.027
- Berridge, K. C., and Kringelbach, M. L. (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology* 199, 457–480. doi: 10.1007/s00213-008-1099-6
- Berridge, K. C., Robinson, T. E., and Aldridge, J. W. (2009). Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 65–73. doi: 10.1016/j.coph.2008.12.014
- Borgers, A. J., Koopman, K. E., Bisschop, P. H., Serlie, M. J., Swaab, D. F., Fliers, E., et al. (2014). Decreased serotonin transporter immunoreactivity in the human hypothalamic infundibular nucleus of overweight subjects. *Front. Neurosci.* 8:106. doi: 10.3389/fnins.2014.00106
- Bravo, J. A., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2014). Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT_{1A} receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Front. Mol. Neurosci.* 7:24. doi: 10.3389/fnmol.2014.00024
- Cattane, N., Mora, C., Lopizzo, N., Borsini, A., Maj, C., Pedrini, L., et al. (2019). Identification of a miRNAs signature associated with exposure to stress early in life and enhanced vulnerability for schizophrenia: new insights for the key role of miR-125b-1-3p in neurodevelopmental processes. *Schizophr. Res.* 205, 63–75. doi: 10.1016/j.schres.2018.07.030
- Chen, Y., and Baram, T. Z. (2016). Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. *Neuropsychopharmacology* 41, 197–206. doi: 10.1038/npp.2015.181
- Chmielarz, P., Konovalova, J., Najam, S. S., Alter, H., Piepponen, T. P., Erfle, H., et al. (2017). Dicer and microRNAs protect adult dopamine neurons. *Cell Death Dis.* 8:e2813. doi: 10.1038/cddis.2017.214
- Chooi, Y. C., Ding, C., and Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism* 92, 6–10. doi: 10.1016/j.metabol.2018.09.005
- da Silva, A. A. M., Oliveira, M. M., Cavalcante, T. C. F., do Amaral Almeida, L. C., Cruz, P. L. M., and de Souza, S. L. (2017). Undernutrition during pregnancy and lactation increases the number of fos-cells in the reward system in response to a 5-HT₆ receptor agonist in male adolescent rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 69, 488–493. doi: 10.1080/09637486.2017.1382455
- de Lima, R. M. S., dos Santos, Bento, L. V., di Marcello Valladão Lugon, M., Barauna, V. G., Bittencourt, A. S., et al. (2020). Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. *Behav. Brain Res.* 379:112399. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112399
- de Souza, J. A., da Silva, M. C., Costa, F. C. O., de Matos, R. J. B., de Farias Campina, R. C., do Amaral Almeida, L. C., et al. (2020a). Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 192:172908. doi: 10.1016/j.pbb.2020.172908
- de Souza, J. A., do Amaral Almeida, L. C., Tavares, G. A., Falcão, L. A. L., Beltrão, L. C., et al. (2020b). Dual exposure to stress in different stages of development affects eating behavior of male Wistar rats. *Physiol. Behav.* 214:112769. doi: 10.1016/j.physbeh.2019.112769
- de Souza, J. A., da Silva, M. C., de Matos, R. J. B., do Amaral Almeida, L. C., Beltrão, L. C., de Souza, F. L., et al. (2018). Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. *Appetite* 123, 114–119. doi: 10.1016/j.appet.2017.12.004
- Entringer, S., Buss, C., and Heim, C. (2016). Early-life stress and vulnerability for disease in later life. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 59, 1255–1261. doi: 10.1007/s00103-016-2436-2
- Eszlari, N., Petschner, P., Gonda, X., Baksa, D., Elliott, R., Anderson, I. M., et al. (2019). Childhood adversity moderates the effects of HTR2A Epigenetic regulatory polymorphisms on rumination. *Front. Psychiatry* 10:394. doi: 10.3389/fpsyt.2019.00394
- Gaiser, E. C., Gallezot, J. D., Worhunsky, P. D., Jastreboff, A. M., Pittman, B., Kantrovitz, L., et al. (2016). Elevated dopamine D_{2/3} receptor availability in obese individuals: a PET imaging study with [¹¹C](+)-PHNO. *Neuropsychopharmacology* 41, 3042–3050. doi: 10.1038/npp.2016.115
- Gangisetty, O., Jabbar, S., Wynne, O., and Sarkar, D. K. (2017). MicroRNA-9 regulates fetal alcohol-induced changes in D2 receptor to promote prolactin production. *J. Endocrinol.* 235, 1–14. doi: 10.1530/joe-17-0135
- Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Prados, J., et al. (2014). Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* 17, 667–669. doi: 10.1038/nn.3695
- Giannaccini, G., Betti, L., Palego, L., Marsili, A., Santini, F., Pelosini, C., et al. (2013). The expression of platelet serotonin transporter (SERT) in human obesity. *BMC Neurosci.* 14:128. doi: 10.1186/1471-2202-14-128
- González, L. M., Mota-Zamorano, S., García-Herráiz, A., López-Nevado, E., and Gervasini, G. (2019). Genetic variants in dopamine pathways affect personality dimensions displayed by patients with eating disorders. *Eat. Weight Disord.* doi: 10.1007/s40519-019-00820-7 [Epub ahead of print].
- Guo, J., Simmons, W. K., Herscovitch, P., Martin, A., and Hall, K. D. (2014). Striatal dopamine D2-like receptor correlation patterns with human obesity and opportunistic eating behavior. *Mol. Psychiatry* 19, 1078–1084. doi: 10.1038/mp.2014.102
- Halford, J., Harrold, J., Lawton, C., and Blundell, J. (2012). Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr. Drug Targets* 6, 201–213. doi: 10.2174/1389450053174550
- Harrison, E. L., and Baune, B. T. (2014). Modulation of early stress-induced neurobiological changes: a review of behavioural and pharmacological interventions in animal models. *Transl. Psychiatry* 4:e390. doi: 10.1038/tp.2014.31
- Heisler, L. K., Jobst, E. E., Sutton, G. M., Zhou, L., Borok, E., Thornton-Jones, Z., et al. (2006). Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron* 51, 239–249. doi: 10.1016/j.neuron.2006.06.004
- Huang, X. F., Han, M., and Störli, L. H. (2004). Differential expression of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor mRNAs in mice prone, or resistant, to chronic high-fat diet-induced obesity. *Mol. Brain Res.* 127, 39–47. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.05.008
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110. doi: 10.1038/nrg2936
- Ikeda, H., Yonemochi, N., Ardianto, C., Yang, L., and Kamei, J. (2018). Pregabalin increases food intake through dopaminergic systems in the hypothalamus. *Brain Res.* 1701, 219–226. doi: 10.1016/j.brainres.2018.09.026
- Issler, O., Haramati, S., Paul, E. D., Maeno, H., Navon, L., Zwang, R., et al. (2014). MicroRNA 135 is essential for chronic stress resiliency, antidepressant efficacy, and intact serotonergic activity. *Neuron* 83, 344–360. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.042
- Jensen, K. P., Covault, J., Conner, T. S., Tennen, H., Kranzler, H. R., and Furneaux, H. M. (2009). A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors. *Mol. Psychiatry* 14, 381–389. doi: 10.1038/mp.2008.15
- Jia, X., Wang, F., Han, Y., Geng, X., Li, M., Shi, Y., et al. (2016). miR-137 and miR-491 negatively regulate dopamine transporter expression and function in neural cells. *Neurosci. Bull.* 32, 512–522. doi: 10.1007/s12264-016-0061-6
- Kikusui, T., and Mori, Y. (2009). Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *J. Neuroendocrinol.* 21, 427–431. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01837.x

- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610. doi: 10.1038/nrg2843
- Lam, D. D., Garfield, A. S., Marston, O. J., Shaw, J., and Heisler, L. K. (2010). Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 84–91. doi: 10.1016/j.pbb.2010.09.003
- Launay, J. M., Mouillet-Richard, S., Baudry, A., Pietri, M., and Kellermann, O. (2011). Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl. Psychiatry* 1:e56. doi: 10.1038/tp.2011.54
- Liu, Y., Liu, D., Xu, J., Jiang, H., and Pan, F. (2017). Early adolescent stress-induced changes in prefrontal cortex miRNA-135a and hippocampal miRNA-16 in male rats. *Dev. Psychobiol.* 59, 958–969. doi: 10.1002/dev.21558
- Majcher-Maslanka, I., Solarz, A., Wędzony, K., and Chocyk, A. (2017). The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 57, 24–33. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.01.001
- Mavrikaki, M., Anastasiadou, E., Ozdemir, R. A., Potter, D., Helmholtz, C., Slack, F. J., et al. (2019). Overexpression of miR-9 in the nucleus accumbens increases oxydase self-administration. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 22, 383–393. doi: 10.1093/ijnp/pyz015
- McAdams, R. M., McPherson, R. J., Beyer, R. P., Bammler, T. K., Farin, F. M., and Juul, S. E. (2015). Dose-dependent effects of morphine exposure on mRNA and microRNA (miR) expression in hippocampus of stressed neonatal mice. *PLoS One* 10:e0123047. doi: 10.1371/journal.pone.0123047
- Meguid, M. M., Fetissov, S. O., Varma, M., Sato, T., Zhang, L., Laviano, A., et al. (2000). Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* 16, 843–857. doi: 10.1016/S0899-9007(00)00449-4
- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., et al. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128.
- Morgane, P. J., Mokler, D. J., and Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 471–483. doi: 10.1016/S0149-7634(02)00012-X
- Moya, P. R., Wendland, J. R., Salemm, J., Fried, R. L., and Murphy, D. L. (2013). MiR-15a and miR-16 regulate serotonin transporter expression in human placental and rat brain raphe cells. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 621–629. doi: 10.1017/S1461145712000454
- Naef, L., Pitman, K. A., and Borgland, S. L. (2015). Mesolimbic dopamine and its neuromodulators in obesity and binge eating. *CNS Spectr.* 20, 574–583. doi: 10.1017/S1092852915000693
- O'Carroll, D., and Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology* 38, 39–54. doi: 10.1038/npp.2012.87
- Ogawa, S. K., and Watabe-Uchida, M. (2018). Organization of dopamine and serotonin system: anatomical and functional mapping of monosynaptic inputs using rabies virus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 174, 9–22. doi: 10.1016/j.pbb.2017.05.001
- Olivier, B. (2015). Serotonin: a never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* 753, 2–18. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.031
- Parade, S. H., Novick, A. M., Parent, J., Seifer, R., Klaver, S. J., Marsit, C. J., et al. (2017). Stress exposure and psychopathology alter methylation of the serotonin receptor 2A (*HTR2A*) gene in preschoolers. *Dev. Psychopathol.* 29, 1619–1626. doi: 10.1017/S0954579417001274
- Phillips, A. G., Vacca, G., and Ahn, S. (2008). A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 236–249. doi: 10.1016/j.pbb.2007.10.014
- Prados, J., Stenz, L., Courtet, P., Prada, P., Nicastro, R., Adouan, W., et al. (2015). Borderline personality disorder and childhood maltreatment: a genome-wide methylation analysis. *Genes Brain Behav.* 14, 177–188. doi: 10.1111/gbb.12197
- Razoux, F., Russig, H., Mueggler, T., Baltes, C., Dikaoui, K., Rudin, M., et al. (2017). Transgenerational disruption of functional 5-HT_{1A}R-induced connectivity in the adult mouse brain by traumatic stress in early life. *Mol. Psychiatry* 22, 519–526. doi: 10.1038/mp.2016.146
- Remmers, F., and Delemarre-van de Waal, H. A. (2011). Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr. Rev.* 32, 272–311. doi: 10.1210/er.2009-0028
- Rentesi, G., Antoniou, K., Marselos, M., Syrrou, M., Papadopoulou-Daifoti, Z., and Konstandi, M. (2013). Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav. Brain Res.* 244, 29–37. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.040
- Resnick, O., Miller, M., Forbes, W., Hall, R., Kemper, T., Bronzino, J., et al. (1979). Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3, 233–246. doi: 10.1016/0149-7634(79)90011-3
- Rivera, H. M., Kievit, P., Kirigiti, M. A., Bauman, L. A., Baquero, K., Blundell, P., et al. (2015). Maternal high-fat diet and obesity impact palatable food intake and dopamine signaling in nonhuman primate offspring. *Obesity* 23, 2157–2164. doi: 10.1002/oby.21306
- Romanova, I. V., Derkach, K. V., Mikhrina, A. L., Sukhov, I. B., Mikhailova, E. V., and Shpakov, A. O. (2018). The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons of normal and obese rodents. *Neurochem. Res.* 43, 821–837. doi: 10.1007/s11064-018-2485-z
- Rosmond, R., Bouchard, C., and Björntorp, P. (2002). 5-HT_{2A} receptor gene promoter polymorphism in relation to abdominal obesity and cortisol. *Obes. Res.* 10, 585–589. doi: 10.1038/oby.2002.79
- Shao, Q. Y., You, F., Zhang, Y. H., Hu, L. L., Liu, W. J., Liu, Y., et al. (2018). CSF miR-16 expression and its association with miR-16 and serotonin transporter in the raphe of a rat model of depression. *J. Affect. Disord.* 238, 609–614. doi: 10.1016/j.jad.2018.06.034
- Shi, S., Leites, C., He, D., Schwartz, D., Moy, W., Shi, J., et al. (2014). MicroRNA-9 and microRNA-326 regulate human dopamine D2 receptor expression, and the microRNA-mediated expression regulation is altered by a genetic variant. *J. Biol. Chem.* 289, 13434–13444. doi: 10.1074/jbc.M113.535203
- Song, M. F., Dong, J. Z., Wang, Y. W., He, J., Ju, X., Zhang, L., et al. (2015). CSF miR-16 is decreased in major depression patients and its neutralization in rats induces depression-like behaviors via a serotonin transmitter system. *J. Affect. Disord.* 178, 25–31. doi: 10.1016/j.jad.2015.02.022
- Spadaro, P. A., Naug, H. L., Du Toit, E. F., Donner, D., and Colson, N. J. (2015). A refined high carbohydrate diet is associated with changes in the serotonin pathway and visceral obesity. *Genet. Res.* 97:e23. doi: 10.1017/S0016672315000233
- Suderman, M., Borghol, N., Pappas, J. J., Pinto Pereira, S. M., Pembrey, M., Hertzman, C., et al. (2014). Childhood abuse is associated with methylation of multiple loci in adult DNA. *BMC Med. Genomics* 7:13. doi: 10.1186/1755-8794-7-13
- Tavares, G. A., Cavalcanti do Amaral Almeida, L., Araújo de Souza, J., Leitão de Souza, F., Feitosa Braz, G. R., Times Silva, B., et al. (2020a). Early weaning modulates eating behavior and promotes hypofunction of the serotonergic (5HT) system in juvenile male rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 80, 209–219. doi: 10.1002/jdn.10018
- Tavares, G. A., do Amaral Almeida, L. C., de Souza, J. A., de Farias, V. V., de Souza, F. L., de Andrade Silva, S. C., et al. (2020b). Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats. *Behav. Brain Res.* 383:112531. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112531
- Tavares, G. A., do Amaral Almeida, L. C., de Souza, J. A., Feitosa Braz, G. R., da Silva, M. C., Lagranha, C. J., et al. (2019). Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations. *Behav. Processes* 170:103981. doi: 10.1016/j.beproc.2019.103981
- Thomsen, M., Barrett, A. C., Butler, P., Negus, S. S., and Caine, S. B. (2017). Effects of acute and chronic treatments with dopamine D₂ and D₃ receptor ligands on cocaine versus food choice in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 362, 161–176. doi: 10.1124/jpet.117.241141
- Tobón, K. E., Catuzzi, J. E., Cote, S. R., Sonaike, A., and Kuzhikandathil, E. V. (2015). Post-transcriptional regulation of dopamine D1 receptor expression in caudate-putamen of cocaine-sensitized mice. *Eur. J. Neurosci.* 42, 1849–1857. doi: 10.1111/ejn.12933
- Tobón, K. E., Chang, D., and Kuzhikandathil, E. V. (2012). MicroRNA 142-3p mediates post-transcriptional regulation of D1 dopamine receptor expression. *PLoS One* 7:e49288. doi: 10.1371/journal.pone.0049288
- Truscott, M., Islam, A. B. M. M. K., and Frolov, M. V. (2016). Novel regulation and functional interaction of polycistronic miRNAs. *RNA* 22, 129–138. doi: 10.1261/rna.053264.115
- Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Funato, H., Hobara, T., Otsuki, K., et al. (2010). Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J. Neurosci.* 30, 15007–15018. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1436-10.2010

- Van Der Knaap, L. J., Riese, H., Hudziak, J. J., Verbiest, M. M. P. J., Verhulst, F. C., Oldehinkel, A. J., et al. (2015). Adverse life events and allele-specific methylation of the serotonin transporter gene (SLC6A4) in adolescents. *Psychosom. Med.* 77, 246–255. doi: 10.1097/PSY.0000000000000159
- van Galen, K. A., ter Horst, K. W., Booij, J., la Fleur, S. E., and Serlie, M. J. (2018). The role of central dopamine and serotonin in human obesity: lessons learned from molecular neuroimaging studies. *Metabolism* 85, 325–339. doi: 10.1016/j.metabol.2017.09.007
- Viola, T. W., Wearick-Silva, L. E., De Azeredo, L. A., Centeno-Silva, A., Murphy, C., Marshall, P., et al. (2016). Increased cocaine-induced conditioned place preference during periadolescence in maternally separated male BALB/c mice: the role of cortical BDNF, microRNA-212, and MeCP2. *Psychopharmacology* 233, 3279–3288. doi: 10.1007/s00213-016-4373-z
- Vogel Ciernia, A., Laufer, B. I., Dunaway, K. W., Mordaunt, C. E., Coulson, R. L., Toah, T. S., et al. (2018). Experience-dependent neuroplasticity of the developing hypothalamus: integrative epigenomic approaches. *Epigenetics* 13, 318–330. doi: 10.1080/15592294.2018.1451720
- Volkow, N. D., Wang, G. J., and Baler, R. D. (2011). Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn. Sci.* 15, 37–46. doi: 10.1016/j.tics.2010.11.001
- Volpicelli, F., Speranza, L., Pulcrano, S., De Gregorio, R., Crispino, M., De Sanctis, C., et al. (2019). The microRNA-29a modulates serotonin 5-HT7 receptor expression and its effects on hippocampal neuronal morphology. *Mol. Neurobiol.* 56, 8617–8627. doi: 10.1007/s12035-019-01690-x
- Wang, P., Cao, T., Chen, J., Jiang, Y., Wang, C., Waddington, J. L., et al. (2019). D2 receptor-mediated miRNA-143 expression is associated with the effects of antipsychotic drugs on phencyclidine-induced schizophrenia-related locomotor hyperactivity and with Neuregulin-1 expression in mice. *Neuropharmacology* 157:107675. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107675
- Wankerl, M., Miller, R., Kirschbaum, C., Hennig, J., Stalder, T., and Alexander, N. (2014). Effects of genetic and early environmental risk factors for depression on serotonin transporter expression and methylation profiles. *Transl. Psychiatry* 4:e402. doi: 10.1038/tp.2014.37
- Wise, R. (1989). Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.* 40, 191–225. doi: 10.1146/annurev.psych.40.1.191
- Wohlfarth, C., Schmitteckert, S., Härtle, J. D., Houghton, L. A., Dweep, H., Fortea, M., et al. (2017). MiR-16 and miR-103 impact 5-HT4 receptor signalling and correlate with symptom profile in irritable bowel syndrome. *Sci. Rep.* 7:14680.
- Wu, D. M., Wang, S., Wen, X., Han, X. R., Wang, Y. J., Shen, M., et al. (2018). Inhibition of microRNA-200a upregulates the expression of striatal dopamine receptor d2 to repress apoptosis of striatum via the cAMP/PKA signaling pathway in rats with Parkinson's disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 51, 1600–1615. doi: 10.1159/000495649
- Wu, X., Xu, F., Xia, X., Wang, B. J., and Yao, J. (2020). MicroRNA-15a, microRNA-15b and microRNA-16 inhibit the human dopamine D1 receptor expression in four cell lines by targeting 3'UTR –12 bp to + 154 bp. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 48, 276–287. doi: 10.1080/21691401.2019.1703729
- Xie, L., Chen, J., Ding, Y. M., Gui, X. W., Wu, L. X., Tian, S., et al. (2019). MicroRNA-26a-2 maintains stress resiliency and antidepressant efficacy by targeting the serotonergic autoreceptor HTR1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 511, 440–446. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.078
- Xu, J., Wang, R., Liu, Y., Liu, D., Jiang, H., and Pan, F. (2017). FKBP5 and specific microRNAs via glucocorticoid receptor in the basolateral amygdala involved in the susceptibility to depressive disorder in early adolescent stressed rats. *J. Psychiatr. Res.* 95, 102–113. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.08.010
- Yang, Y., Hu, Z., Du, X., Davies, H., Huo, X., and Fang, M. (2017). miR-16 and fluoxetine both reverse autophagic and apoptotic change in chronic unpredictable mild stress model rats. *Front. Neurosci.* 11:428. doi: 10.3389/fnins.2017.00428
- Yu, Y., Patch, C., Weston-Green, K., Zhou, Y., Zheng, K., and Huang, X. F. (2018). Dietary galacto-oligosaccharides and resistant starch protect against altered CB1 and 5-HT1A and 2A receptor densities in rat brain: implications for preventing cognitive and appetite dysfunction during a high-fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.* 62:e1800422. doi: 10.1002/mnfr.201800422
- Zha, W., Ho, H. T. B., Hu, T., Hebert, M. F., and Wang, J. (2017). Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance. *Sci. Rep.* 7:1137. doi: 10.1038/s41598-017-01291-5
- Zhang, Y., Wang, Y., Wang, L., Bai, M., Zhang, X., and Zhu, X. (2015). Dopamine receptor D2 and associated microRNAs are involved in stress susceptibility and resistance to escitalopram treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18:pyv025. doi: 10.1093/ijnp/pyv025
- Zhang, Y., Zhu, X., Bai, M., Zhang, L., Xue, L., and Yi, J. (2013). Maternal deprivation enhances behavioral vulnerability to stress associated with miR-504 expression in nucleus accumbens of rats. *PLoS One* 8:e69934. doi: 10.1371/journal.pone.0069934
- Zhao, J., Tian, H., Song, H., Wang, X., Luo, T., Ai, L., et al. (2019). Effect of electroacupuncture on reuptake of serotonin via mirna-16 expression in a rat model of depression. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2019:7124318. doi: 10.1155/2019/7124318
- Zhao, Y., Zhang, J., Yang, H., Cui, D., Song, J., Ma, Q., et al. (2017). Memory retrieval in addiction: a role for miR-105-mediated regulation of D1 receptors in mPFC neurons projecting to the basolateral amygdala. *BMC Biol.* 15:128. doi: 10.1186/s12915-017-0467-2
- Zisoulis, D. G., Kai, Z. S., Chang, R. K., and Pasquinelli, A. E. (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature* 486, 541–544. doi: 10.1038/nature11134
- Zurawek, D., Kusmider, M., Faron-Gorecka, A., Gruca, P., Pabian, P., Solich, J., et al. (2017). Reciprocal microRNA expression in mesocortical circuit and its interplay with serotonin transporter define resilient rats in the chronic mild stress. *Mol. Neurobiol.* 54, 5741–5751. doi: 10.1007/s12035-016-0107-9

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Tavares, Torres and de Souza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Ofício nº 53/18

Recife, 04 de julho de 2018.

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Sandra Lopes de Souza**
Departamento de Anatomia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0020/2018

Certificamos que a proposta intitulada "**Desmame precoce e comportamento alimentar: um estudo do sistema serotoninérgico.**", Registrada com o nº 0020/2018 sob a responsabilidade de **Prof.ª Sandra Lopes de Souza** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 04/07/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/06/2018 a 06/06/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	78
Peso/Idade	Macho 250-300g/180 dias e Femea 200g/120 dias
Sexo	Macho (10) e Femea (68)
Origem	Departamento de Nutrição - UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691