

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

FELIPE LEITÃO DE SOUZA

**EFEITOS DO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O
COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO E SISTEMA OPIOIDÉRGICO EM
RATOS WISTAR JOVENS**

RECIFE

2020

FELIPE LEITÃO DE SOUZA

**EFEITOS DO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O
COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO E SISTEMA OPIOIDÉRGICO EM
RATOS WISTAR JOVENS**

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Área de concentração: Bases experimentais da nutrição

Orientador: Prof. Dr. Sandra Lopes de Souza

Co-orientador: Dr. Julliet Araújo de Souza

RECIFE

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S729e Souza, Felipe Leitão de.
Efeitos do estresse por separação materna sobre o comportamento alimentar hedônico e sistema opioide em ratos *wistar* jovens / Felipe Leitão de Souza. – 2020.
58 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Privação materna. 2. Comportamento alimentar. 3. Peptídeos opioídeos. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-138)

FELIPE LEITÃO DE SOUZA

**EFEITOS DO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O
COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO E SISTEMA OPIOIDÉRGICO EM
RATOS WISTAR JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em: 31/08/2020

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Matilde Cesiana da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Deborah Marques de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida
Fundação Oswaldo Cruz

**Dedico este trabalho a minha querida
Sinda, que me incentivou primeiro.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela sua presença e luz constante. Assim como a minha querida Juliet Araújo, por todo suporte, ensinamentos e inspiração que sempre me fizeram acreditar ser capaz de coisas que pra mim eram inalcançáveis. Minha gratidão à professora Sandra Lopes por toda acolhida e suporte, como também à Larissa Almeida pelos momentos compartilhados e todos os ensinamentos. Um agradecimento especial a Flaydson Clayton e Raísa Costa por sempre estarem presentes nas horas mais difíceis dessa caminhada, da mesma maneira que a minha querida Larisse Couto. Agradeço também a meu amigo Andrés por sua grande ajuda na finalização desse trabalho.

RESUMO

Experiências danosas no período inicial da vida, como a separação materna, são capazes de modificar a reatividade do organismo ao estresse e favorecer a má formação de sistemas. O comportamento alimentar também é bastante afetado por esse estresse precoce. O sistema opioidérgico é um dos sistemas envolvidos no comportamento hedônico alimentar, sendo capaz de mediar respostas tanto para o prazer alimentar como para o consumo de drogas. Dentre os receptores opioidérgicos, o MOR se mostra como principal regulador do sistema de recompensa. Dessa forma, o presente estudo propõe-se investigar as consequências que um estresse causado no início da vida pode provocar em relação ao comportamento alimentar hedônico e sistema opioidérgico de ratos jovens de ambos os sexos. Foram utilizados ratos *wistar* jovens machos e fêmeas que se submeteram a eventos de separação materna e estresse agudo, no qual gerou-se os grupos machos controles (MC) e separados (MS), assim como fêmeas controles (FC) e separadas (FS). Os animais que sofreram estresse agudo formaram os grupos (MCEA), (MSEA), (FCEA), (FSEA). Não foram observadas mudanças no peso corporal. Em relação ao consumo de dieta palatável, (FS) diminuiu a ingestão enquanto (MCEA) e (FCEA) aumentaram. No que diz respeito a expressão do MOR, apenas o grupo (FCEA) se mostrou significativo. Desse modo, A separação materna durante a lactação promoveu ajustes do comportamento alimentar hedônico em fêmeas. No entanto, não provocou diferenças significativas no comportamento alimentar hedônico dos machos. Assim como alterações no peso corporal de ambos os sexos. Por sua vez, o estresse agudo tem influência na modulação do comportamento alimentar hedônico apenas em machos jovens, como também na indução da expressão do receptor MOR apenas em fêmeas.

Palavras-chave: privação materna; comportamento alimentar; peptídeos opioides.

ABSTRACT

Harmful experiences in the early life period, such as maternal separation, are able to modify the body reactivity to stress and promote the malformation of systems. Food behavior intake is also greatly affected by this early stress. The opioidergic system is one of the systems involved in hedonic eating behavior, being capable to mediate responses for food pleasure and drug use. Among opioidergic receptors, MOR is the main regulator of the reward system. The present study aims are investigating the consequences caused by stress in early life in relation to the hedonic eating behavior and opioidergic system on young rats of both sexes. Young male and female *wistar* rats underwent maternal separation and acute stress events were used, in which the control (MC) and separate (MS) male groups were generated, as well as the control (FC) and separate (FS) females. The animals that suffered acute stress formed the groups (MCEA), (MSEA), (FCEA), (FSEA). No changes in body weight were observed. Regarding the consumption of a palatable diet, (FS) decreased intake while (MCEA) and (FCEA) increased. Regarding the expression of MOR, only the group (FCEA) was significant. Thus, maternal separation during lactation promoted adjustments in hedonic feeding behavior in females. However, it did not cause significant differences in the hedonic feeding behavior of the males. As well as changes in body weight of both sexes. In turn, acute stress has an influence on the modulation of hedonic feeding behavior only in young males, as well as in the induction of MOR receptor expression only in females.

Key Words: maternal deprivation; feeding behavior; opioid peptides

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema anatômico e funcional do eixo HPA e estrutura associadas..... | 17 |
| Figura 2 - Controle homeostático do comportamento alimentar..... | 20 |
| Figura 3 - Hotspots hedônicos opiacéos..... | 22 |
| Figura 4 - Esquema simplificado da convergência de ações de quais as drogas realizam no Nac e VTA..... | 23 |
| Figura 5 - Distribuição dos receptores opioidérgicos no tronco cerebral. | 25 |
| Figura 6 - Distribuição dos receptores opioidérgicos nas estruturas subcorticais do cérebro. | 25 |
| Figura 7 - Efeitos da separação materna sobre a evolução ponderal ao nascimento, desmame (21 dias) e pós-desmame (35 dias). | 35 |
| Figura 8 - Efeitos da separação materna sobre a ingestão de alimento palatável antes e após o estresse alimentar agudo..... | 36 |
| Figura 9 - Efeitos da separação materna sobre a expressão do receptor opioidérgico MOR em animais que sofreram ou não estresse agudo. | 36 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AgRP - Neuropeptídeo Relacionado à Proteína Agouti

ARC - Núcleo Arqueado do Hipotálamo

CART - Neuropeptídeo dependentes da Transcrição Cocaína-Anfetamina

CBG - Globulinas de Ligação a Corticosterona

CORT - Corticosterona

CRF - Fator de Liberação de Corticotrofina

CRH - Corticotrofina

DOR - Receptor Delta Opioide

GH - Hormônio do Crescimento

HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HPG - Hipotálamo-Pituitária-Gonadal

KOR - Receptor Kappa Opioide

LHA - Hipotálamo Lateral

MCH - Hormônio Concentrador de Melanina

MC4R - Receptor de Melanina 4

MOR - Receptor Mu Opioide

Nac - Núcleo Accumbens

Ne3c1 - Gene Receptor de Glicocorticoide

NPY - Neuropeptídeo Y

NTS - Núcleo do Trato Solitário

SNC - Sistema Nervoso Central

VTA - Área Tegumentar Ventral

PVN - Núcleo Paraventricular

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 14 |
| 2.1 | Importância da relação mãe-filho | 14 |
| 2.2 | Separação materna e eixo HPA | 16 |
| 2.3 | Separação materna e suas consequências fenotípicas emocionais | 18 |
| 2.4 | Comportamento alimentar | 19 |
| 2.5 | Separação materna e comportamento alimentar hedônico | 21 |
| 2.6 | Sistema hedônico e abuso de drogas..... | 23 |
| 2.7 | Sistema opioidegico..... | 24 |
| 2.8 | Sistema opioidegico, separação materna e comportamento alimentar | 26 |
| 3 | HIPÓTESE..... | 29 |
| 4 | OBJETIVOS | 30 |
| 4.1 | Objetivo geral | 30 |
| 4.2 | Objetivos específicos | 30 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 5.1 | Animais..... | 31 |
| 5.2 | Separação materna e formação dos grupos experimentais | 31 |
| 5.3 | Ingestão de alimento palatável..... | 32 |
| 5.4 | Ingestão de alimento palatável após estresse alimentar agudo..... | 32 |
| 5.5 | Análise da expressão gênica do receptor opioidegico μ no tronco encefálico..... | 33 |
| 5.5.1 | Eutanásia e obtenção do hipotálamo..... | 33 |
| 5.5.2 | Análise gênica..... | 33 |
| 5.6 | Análise estatística | 34 |
| 6 | RESULTADOS | 35 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6.1 | Evolução ponderal..... | 35 |
| 6.2 | Ingestão alimentar antes e após estresse alimentar agudo..... | 36 |
| 6.3 | Expressão do receptor opioidegico MOR no hipotálamo | 36 |
| 7 | DISCUSSÃO..... | 37 |
| 8 | CONCLUSÃO | 42 |
| | REFERÊNCIAS | 43 |
| | APÊNDICE A - COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL | 59 |

1 INTRODUÇÃO

O período de lactação mostra-se de suma importância para o contínuo e correto desenvolvimento do organismo após o nascimento, visto que, é nessa idade que ocorrem sucessivas e intensas mudanças no corpo do indivíduo (WESTERGA; GRAMSBERGEN; 1990; FAGIOLINI; et al, 1994). Logo, a genitora se apresenta como peça fundamental para a garantia do sucesso das transformações das quais o jovem animal passará nessa idade.

Nesse contexto, o contato entre a mãe e o filhote, acaba por se tornar uma via da qual o jovem começará a reconhecer e se adaptar a sua nova realidade fora do útero, por meio dos cuidados realizados por sua progenitora (KOJIMA; et al. 2012). Dessa forma, os padrões neurocomportamentais, bioquímicos e endócrinos se formam via proteção, nutrição e cuidado materno (CONDE-AGUDELO; et al, 2011; NAKAMURA; et al, 2008; ITO; et al, 2006; PLAUT; DAVIS, 1972).

Sabe-se que os níveis de corticosterona precisam estar baixos para favorecer o bom desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (MEYER, 1985). Logo, é justamente nesse fato que os perigos da exposição ao estresse nos períodos iniciais da vida se mostram. Pois eventos como diminuição de mitose e mielinização, assim como alterações na morfogênese e sinaptogênese neural podem ocorrer (LEVINE, 1991; BOHN, 1984). Nesse âmbito, experimentos que promovem a resposta ao estresse no início da vida, como a separação materna, são aplicados nesses estudos (SOUZA et al, 2020a; SOUZA et al, 2020b; SOUZA et al, 2018; SILVA et al, 2014). A separação materna causa uma resposta ao estresse a partir da liberação de corticosterona (KUHN, 1990; LEVINE, 1991). Isso se dá através da ativação precoce do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, que no período de lactação encontra-se quiescente. Dessa forma, o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, apresenta-se como mediador da resposta ao estresse (MEYER, 1985).

O comportamento alimentar é definido como um conjunto de vários circuitos nervosos que têm por finalidade controlar a ingestão alimentar de um organismo (RUI, 2013). Biomoléculas periféricas têm a capacidade de atuarem no controle da ingestão alimentar (SCHWARTZ, 2000). Didaticamente é possível dividir o comportamento alimentar em dois pilares, o homeostático e o hedônico. Sendo esse último capaz de

fazer o indivíduo comer mesmo estando saciado (STOJAKOVIC, 2017). Evidentemente, o estresse no período perinatal acarreta uma gama de complicações para esta base do comportamento alimentar. Portanto, maior consumo de dietas palatáveis, resistência a fluoxetina, antecipação da saciedade, alta expressão de receptores dopaminérgicos, são alguns dos exemplos (SOUZA, 2020a; SOUZA, 2020b; SOUZA, 2018). Adentrando ao sistema hedônico, o sistema opioidérgico mostra-se muito atuante, visto que, ele é capaz de mediar respostas hedônicas tanto para o prazer alimentar como para o consumo de drogas. (VAZQUEZ et al, 2005; PECIÑA, BERRIDGE, 2000; EVANS, VACCARINO, 1990).

Dentre os receptores opioidérgicos, o MOR, mostra-se como principal regulador do sistema de recompensa (PECIÑA, BERRIDGE, 2000; EVANS, VACCARINO, 1990). Sendo mais expresso na amígdala, gânglios da base, tálamo e hipotálamo (HIRVONEN et al, 2009; FROST et al, 1985). Agonistas opioides em regiões encefálicas hedônicas promoveram um aumento na motivação alimentar (GIULIANO; COTTONE, 2015; ZHANG; BALMADRID; KELLEY, 2003). Da mesma forma que antagonistas de MOR deturpam a preferência por soluções açucaradas (LE MAGNEN; et al, 1980).

Dessa forma, o presente estudo propõe-se investigar as consequências que um estresse causado no início da vida pode provocar em relação ao comportamento alimentar hedônico de ratos jovens de ambos os sexos, no quesito que engloba o sistema opioidérgico. Comportamento hedônico esse responsável pelas sensações de prazer e que compartilha as mesmas vias neurais que correspondem ao consumo de drogas, no qual gastos governamentais e danos à saúde caracterizam-se como alguns dos malefícios acarretados pelo consumo desses narcóticos. Assim como a depressão e obesidade, juntamente causadas pelo estresse precoce após o nascimento. Portanto, é de suma importância compreender mais de todo esse mecanismo e suas consequências.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Importação da relação mãe-filho

O contato entre mãe e filhote nas semanas posteriores ao nascimento, ou seja, no período de lactação, é considerado vital (PLAUT; DAVIS, 1972). Uma vez que, é nesse período que a genitora por meio de seus cuidados estimula e incita o filhote a reconhecer e se acomodar ao novo ambiente (KOJIMA; et al. 2012). É neste espaço de tempo que o organismo aprende padrões neurocomportamentais, bioquímicos e endócrinos (CONDE-AGUDELO; et al, 2011; NAKAMURA; et al, 2008; ITO; et al, 2006). Portanto, a nutrição e proteção desempenhados pela mãe corroboram para o pleno desenvolvimento da ninhada (PLAUT; DAVIS, 1972).

De fato, o período de lactação é responsável por constantes e intensas transformações no corpo do animal. Já que muitos sistemas sensoriais já atuam com o objetivo de manter a homeostase após o nascimento, ainda que apresentem um incompleto desenvolvimento e maturação. Prova disso são as áreas corticais responsáveis pela visão, imaturas até o décimo nono dia pós-natal, mesmo com a abertura dos olhos no décimo quinto dia de vida (WESTERGA, J. GRAMSBERGEN, A. 1990; FAGIOLINI et al, 1994).

Todo o processo de neurogênese ocorrido nesse estágio, acaba por tornar o encéfalo bastante suscetível a interferências ambientais (ANDERSEN, 2003; AISA, B. et al, 2007). Sendo assim, padrões estruturais e funcionais do desenvolvimento cerebral podem ser comprometidos por adversidades impostas nesse período delicado (ANDERSEN, TEICHER, 2009). Logo, é possível identificar uma vulnerabilidade pós-natal, pelo fato de existir uma susceptibilidade a um agente estressor ambiental, que pode promover consideráveis alterações neurobiológicas, cognitivas e comportamentais. (SOUZA, et al, 2020a; SOUZA, et al, 2020b; ANDERSEN, TEICHER, 2009; AISA et al, 2009; BRENHOUSE, ANDERSEN, 2011; ADRIANI, LAVIOLA, 2004; ANDERSEN, 2003).

Problemas na infância, de natureza cognitiva e neurológica, são comumente associados a estresse e depressão materna. Pois o ato de acalmar, nutrir e proteger são vitais para o adequado desenvolvimento do animal (KRISTAL, 2009). Dessa

forma, é esperado que casos de comportamentos hiperativos, déficit de atenção, além de transtornos de ansiedade, abusos de drogas e sintomas de depressão possam surgir em humanos com histórico de carência materna, ou seja, aqueles que foram negligenciados do cuidado da mãe de alguma maneira (LUPIEN, 2009; GLOVER, 1997; STOTT, 1973). Além disso, em modelos experimentais, estudos com primatas mostraram que separações repetidas e imprevisíveis da mãe, episódios de amamentação sem horário fixo e comportamento materno abusivo, foram capazes de alterar por anos a atividade do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), após o evento adverso (LUPIEN, 2009; SANCHEZ, 2006, SANCHEZ, 2005; COPLAN, 1996). Bem como a predisposição ao desenvolvimento de depressão, a sentir dor, consumir drogas e maior comportamento agressivo, em ratos. (CUI, Y et al, 2020; BORZADARAN, F. M et al, 2020; ODEON, M. M, ACOSTA G. B, 2019) .

Desse modo, ao perceber a importância da interação entre mãe filho, principalmente nos primeiros momentos de vida, técnicas como o Método Mãe Canguru, foram implantadas nas redes de saúde. Esse procedimento consiste em manter a todo momento, junto a sua mãe, os bebês recém-nascidos, prematuros ou aqueles que apresentam um baixo peso, de forma que a pele da criança fique sempre em contato com a de sua mãe (CONDEAGUDELO, A. et al., 2011), assim como ocorre com alguns mamíferos metatérios como cangurus (AMALIYA, S., RUSTINA, Y., AGUSTINI, N. 2017).

As vantagens dessa prática se mostram na redução da morbidade, ou seja, diminuição de um conjunto de causas que podem gerar uma enfermidade, além da limitação da mortalidade dos neonatos, juntamente a um aumento nas medidas de crescimento, amamentação e atenuação do estresse oxidativo em relação aqueles que permaneciam nas incubadoras (FORD; et al, 2020; KURNIAWATI; RUSTINA; BUDIATI, 2019; CALDJI; C. et al, 2000). Ademais, foi observado que bebês prematuros que ficavam em incubadoras, distante de suas mães, apresentavam, por exemplo, uma maior aceleração cardíaca quando comparados àqueles que mantiveram contato com a genitora através do Método Mãe Canguru (KOMMERS; et al, 2017). Assim, percebe-se mais uma vez que a separação entre mãe e filho é considerada um estresse que o bebê não está preparado para lidar (MORGAN, B. E. et al., 2011). Portanto, a separação materna possivelmente pode ser utilizada na

tentativa de representar não apenas a distância materna, mas uma gama de abusos que um indivíduo pode sofrer ao decorrer da infância.

2.2 Separação materna e eixo HPA

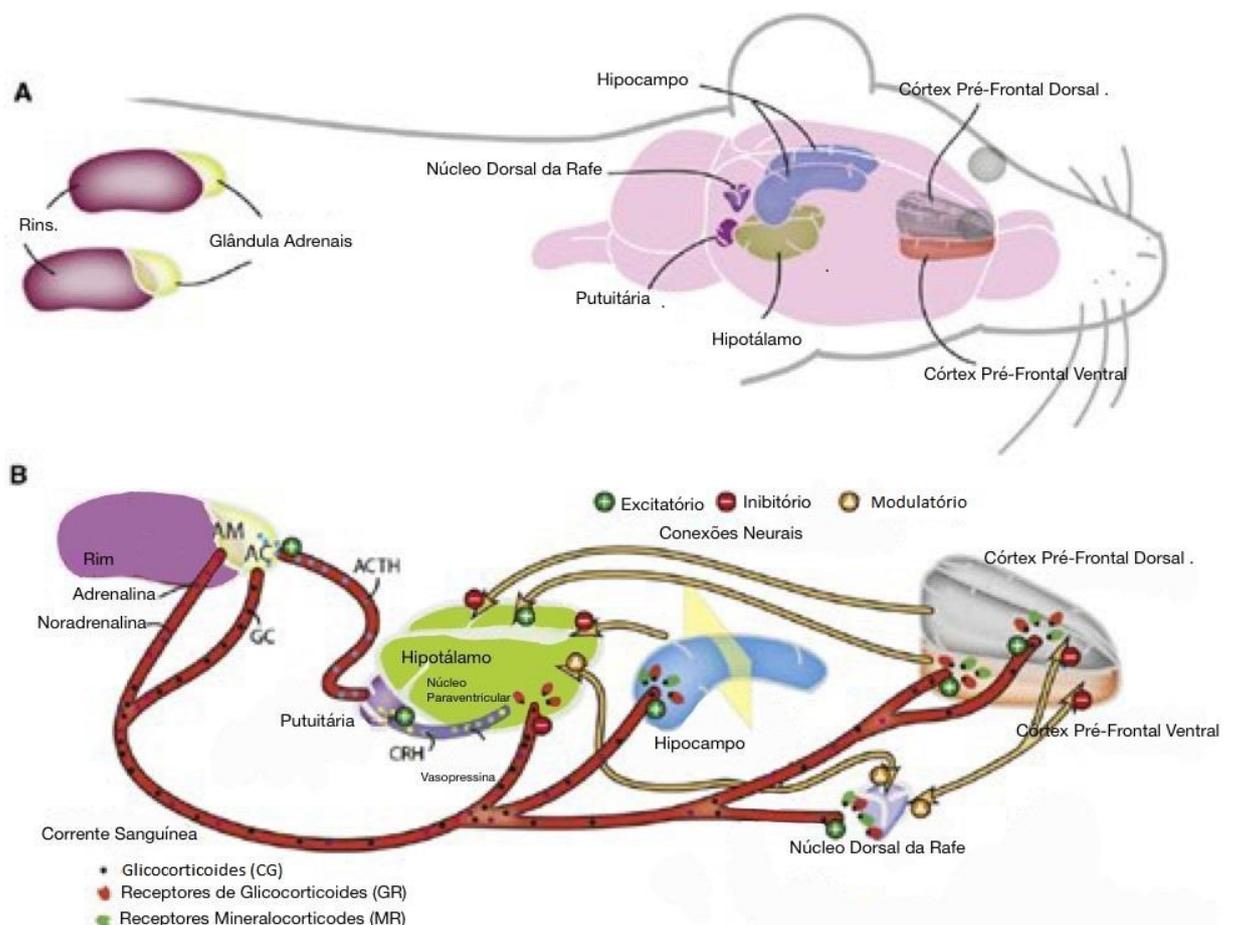
O cuidado materno realizado pela genitora também foi capaz de manter a hiporesponsividade do estresse em proles de estudos experimentais, juntamente a fisiologia do animal que favorecia uma hiporesponsividade ao estresse. Nessa circunstância, quando os filhotes eram separados temporariamente de suas mães, havia um aumento dos níveis de corticosterona (CORT), hormônio responsável por desencadear uma resposta a estímulos estressantes em ratos, evidência não observadas em animais que permaneceram o tempo todo com sua genitora (KUHN, 1990; LEVINE, 1991). Uma das razões para esse feito seria a indução da secreção do hormônio do crescimento (GH) por comportamentos maternos de rotina (LEVINE, 1991; KUHN; PAUK; SCHANBERG, 1990; KUHN; BUTLER; SCHANBERG, 1978). Logo, esse período quiescente ao estresse ficou conhecido como hiporesponsivo. A fisiologia do rato filhote contribui para a manutenção da hiporesponsividade, pois nesse período o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) responde de forma mínima a CORT, que mostra dessa maneira que o córtex da adrenal é relativamente insensível ao ACTH. Ademais, o fator de liberação de corticotropina (CRF) e o ACTH são produzidos e liberados em níveis baixos (LEVINE, 1991). Nesse contexto, existem receptores de glicocorticoides na hipófise dos filhotes da mesma maneira que nos animais adultos, no entanto, os níveis de globulina de ligação a corticosterona (CBG) encontram-se em baixas concentrações no período hiporesponsivo. Dessa maneira, a maior parte da corticosterona circulante no plasma está na sua forma não ativa (LEVINE, 1991; HENNING, 1978). Logo, essa leve quantidade de CORT circulante que favorecem o bom desenvolvimento no Sistema Nervoso Central (SNC) (MEYER, 1985).

Dessa forma, diversos métodos de separação materna foram desenvolvidos com o objetivo de ativar precocemente o eixo HPA e investigar suas consequências (LEVINE, 1991). Nesse contexto, altas quantidades de glicocorticoides, como a corticosterona, em momentos críticos do desenvolvimento, como o período de

lactação, são considerados altamente prejudiciais, pois promovem eventos como diminuição de mitose e mielinização, assim como alterações na morfogênese e sinaptogênese neural (LEVINE, 1991; BOHN, 1984). Ademais, o eixo HPA inicia sua atividade quando o hormônio liberador de corticotrofina (CRF) é ativado. Esse promove a liberação do (ACTH) pela hipófise, ou pituitária, que excita as suprarrenais, ou adrenais, a expelir seus glicocorticoides, que podem ser corticosterona, no caso de roedores, ou cortisol no caso de humanos (Figura 1). (RIVAROLA, 2014; KIKUSUI; MORI, 2009).

Por outro lado, a separação materna é uma técnica que consiste em separar os filhotes de sua mãe por um período de tempo em determinados estágios do período de lactação (SOUZA et al, 2020a; SOUZA et al, 2020b; SOUZA et al, 2018; SILVA et al, 2014). Existem diversos protocolos pra tal, no qual se diferenciam a duração em que a prole fica distante da mãe. Sendo 15 min, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 24h alguns horários já estabelecidos. (SOUZA et al, 2020; YANG et al, 2019; COMASCO et al, 2015; SILVA et al, 2014; LEVINE, 1991). No qual 3h já é considerado suficiente para ativar o eixo HPA precocemente e suas consequências (SOUZA et al, 2020; SOUZA et al, 2018; SILVA et al, 2014).

Figura 1 - Esquema anatômico e funcional do eixo HPA e estrutura associadas



Fonte: Figura modificada do artigo: “*Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability*”, Tamara et al, Neuron, volume 75, 2012.

Legenda: **(A):** Principais componentes do eixo HPA e estruturas cerebrais conectadas. **(B):** Conexões entre o hipotálamo, a hipófise e as glândulas suprarrenais no eixo HPA e o hipocampo e ação fisiológica do eixo HPA.

2.3 Separação materna e suas consequências fenotípicas emocionais

Apesar dos animais sofrerem a separação materna no início da vida, muitas de suas consequências se revelam em outras épocas. Nesse contexto, ratos adultos separados apresentaram condutas ansiosas e depressivas quando submetidos a testes comportamentais como Labirinto em Cruz Elevada, além de Nado Forçado (PAPADAKAKIS, 2019). Os ratos também apresentaram características que designam depressão na adolescência (HE; et al, 2019), grande sensibilidade a dor, pré-disposição a consumir voluntariamente drogas como o álcool, além de maior comportamento agressivo, também são sequelas fenotípicas que surgem em animais separados a partir do fim da lactação (CUI, et al, 2020; BORZADARAN, F. M et al, 2020; ODEON, M. M, ACOSTA G. B, 2019).

Entretanto, em estudos humanos, mães com características ansiosas e superprotetoras terminaram por causar um quadro de ansiedade em crianças com idades entre 3 e 6 anos, quando elas eram separadas das genitoras para irem à escola (ORGÍLES, M. et al, 2018). Sabe-se que os primeiros sete anos de vida do homem são justamente o período em que as vias reguladoras da resposta ao estresse estão mais vulneráveis. Consequentemente, crianças que vivem separadas de seus pais, tendem a desenvolver ideias suicidas, estresse pós-traumático, transtornos de ansiedade e depressão (MARTIN, 2018). Como também, altos níveis de estresse na infância como abusos, negligências, etc. São capazes de promover uma série de consequências a longo prazo, como obesidade grave, alcoolismo, abuso de drogas, tentativas de suicídio e depressão (FELLITI et al, 1998).

Portanto, é visto que patologias de importância econômica, como a depressão, desenvolvem-se a partir de abusos na infância. Nesse âmbito, a depressão é umas das responsáveis por extrapolar os gastos governamentais com a saúde em países de média e baixa renda, como também ser o fator mais significativo para o atraso do

desenvolvimento global (CUBILLOS, 2020; URIBE, 2017). Além do mais, o fato de ser depressivo torna a saúde do indivíduo mais fragilizada, agravando o estado de outras doenças como tuberculose e AIDS (CUBILLOS, 2020; FERRARI, 2010).

Como já foi mostrado, o contato entre mãe e filho é vital para adequação do bebê ao novo ambiente existente (KOJIMA, 2012). No entanto, caso a companhia materna não esteja presente, o indivíduo procura do mesmo modo adaptar-se ao espaço em que se encontra. Logo, é esperado que as doenças geradas por todo o estresse exposto na infância promovam ao organismo uma pior resposta aos tratamentos quando comparados com aqueles que não presenciaram nenhum abuso infantil, assim como alterações neurológicas únicas e características, estimuladas pelas influências ambientais, tornando bastante difícil sua cura (MARTIN, 2018). Desse modo, estudos que investigam a separação materna e suas consequências, como a depressão, se mostram de grande notoriedade.

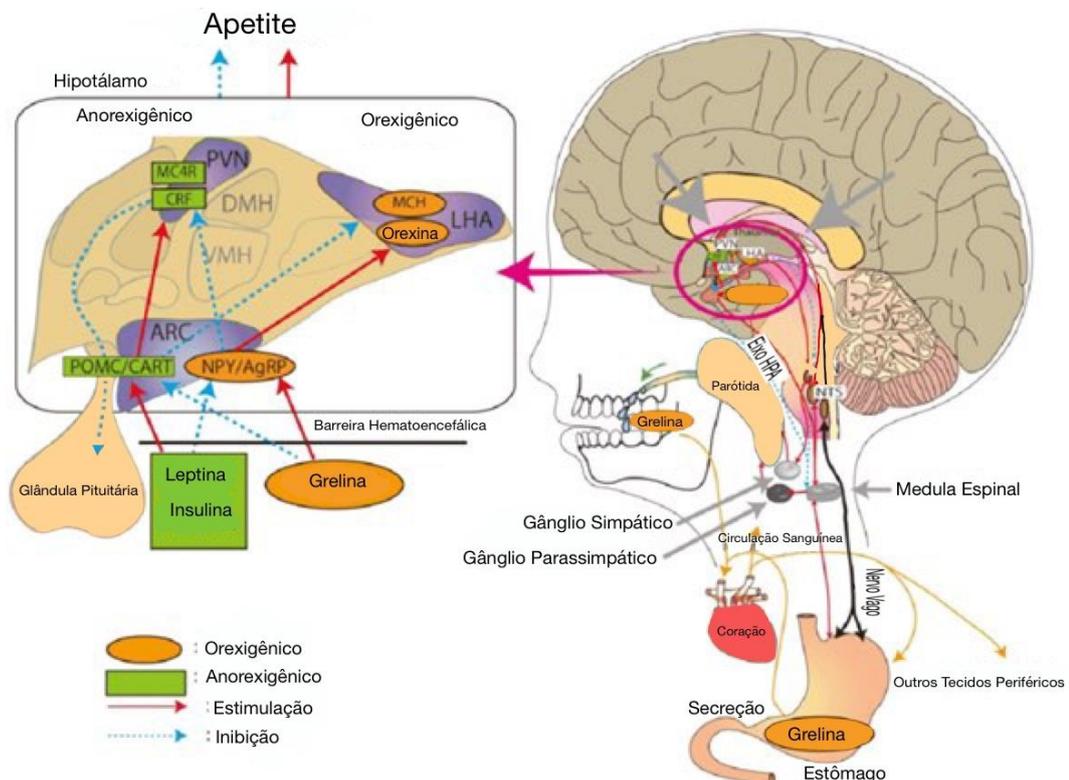
2.4 Comportamento alimentar

No entanto, os danos da separação materna vão muito além da depressão. O comportamento alimentar também é bastante afetado por esse estresse precoce (SOUZA, 2020a; SOUZA, 2020b; SOUZA, 2018; SILVA, 2014). Nesse contexto, o comportamento alimentar, assim como o comportamento sexual, são sistemas que mantêm a perpetuação da espécie. Prova disso, é o fato de ambos os sistemas compartilharem estruturas complexas, como hipotálamo, que por sua vez realiza intrincadas redes neurais, por conta das inúmeras conexões nervosas realizadas por estes sistemas que definem sua complexidade, dado que participa de importantes eixos como o HPA e o Hipotálamo-Pituitária-Gonadal (HPG), (RIVAROLA, 2014; CRADDOCK, 2014; SCHWARTZ, 2000). Dessa forma, espera-se que, pelo fato de serem responsáveis por permitir que os indivíduos continuem a existir no planeta, tanto o controle da ingestão de alimentos como o controle sexual, tenham por característica diversas e complexas vias neurais. Logo, a separação materna apresenta-se bastante perigosa por danificar sistemas tão importantes para ecologia e fisiologia dos seres vivos em si.

Nesse cenário, o comportamento alimentar é o resultado da ação de vários circuitos nervosos que têm por finalidade controlar a ingestão de alimentos, assim como a saciedade (RUI, 2013). Ele pode inclusive incluir fatores biológicos ou não, como condições sociais (LUTTER; NESTLER, 2009). O comportamento alimentar é a base de processos fundamentais para a sobrevivência e manutenção da saúde, como o balanço energético equilibrado, que se define como a relação entre a energia consumida e energia gasta (STEPEN, 2008).

Além disso, dentre as estruturas pertencentes ao sistema nervoso, o hipotálamo, constitui uma das partes mais importantes para o controle do consumo alimentar, visto a importância do seu papel integrador nos sinais centrais e periféricos. No hipotálamo é possível encontrar determinados grupos de neuropeptídeos que desempenham funções tanto orexigênicas como anorexigênicas. São eles, o relacionado à Proteína Agouti (AgRP) e o Neuropeptídeo Y (NPY), como responsáveis por favorecer a ingestão de alimentos. Assim como os dependentes da Transcrição Cocaína-Anfetamina (CART) e Pró-opiomelanocortina (POMC) diminuem o consumo. Eles são expressos de acordo com balanço de biomoléculas periféricas que atuam no comportamento alimentar (SCHWARTZ, 2000). (Figura 2)

Figura 2 - Controle homeostático do comportamento alimentar.



Fonte: Figura modificada do artigo: “The Role of Ghrelin, Salivary Secretions, and Dental Care in Eating Disorders”, Yagi et al, *Nutrients*, volume 4, 2012.

Legenda: Relação entre os núcleos hipotalâmicos e estruturas periféricas.

À medida que o balanço energético se torna negativo, sinais são criados para geração de fome (STOJAKOVIC, 2017). Nessa ação, alguns hormônios atuam para fazer o indivíduo buscar alimentos. A grelina, excretada pelas células oxínticas estomacais, estimula a expressão dos neuropeptídios orexigênicos, como o AgRP e o NPY, quando o balanço energético do corpo está negativo, causado, por exemplo, por um estado de jejum (GIL-CAMPOS et al, 2006).

Por outro lado, outras substâncias têm por função cessar o consumo alimentar, como a insulina, liberada pelas células beta pancreáticas, ela é capaz de inibir os neurônios orexígenos (AgRP/NPY) e ativar os anorexígenos como o CART e o POMC (BASKIN et al, 1999), que reduz a procura por comida. Assim como a adiponectina e leptina, ambas excretadas pelo tecido gorduroso (NASLUND; HELLSTROM, 2007). No que diz respeito a leptina, quando essa se encontra presente no plasma do sangue, tem por destino o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), no qual bloqueia os neurônios orexigênicos e estimula os anorexigênicos, que diminui o consumo alimentar da mesma forma que a insulina (BASKIN et al., 1999). Já no caso da adiponectina, sua atuação também se dá no hipotálamo, no entanto, o núcleo paraventricular que se torna o alvo, como também a via de ação da sacies, que se dá por meio das melanocortinas (QI et al., 2004).

2.5 Separação materna e comportamento alimentar hedônico

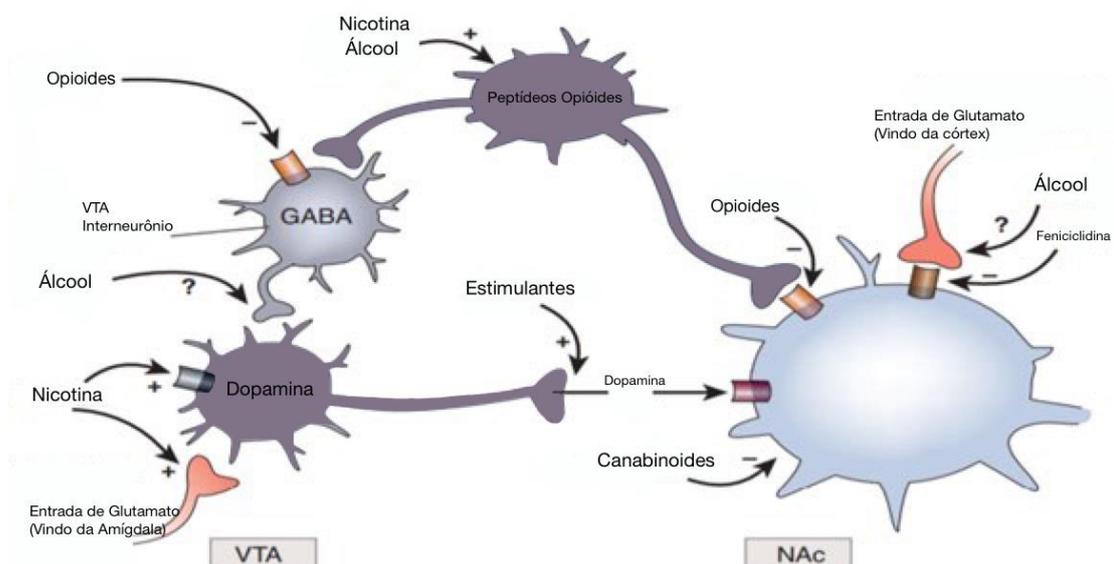
Entretanto, essa regulação denominada homeostática não é exclusiva. Pois existem impulsos, não necessariamente associados ao quociente energético, que têm a capacidade de se sobrepor e causar uma sensação de apetite em situações onde o nível de energia está homeostaticamente adequado (STOJAKOVIC, 2017). Vale ressaltar que os conceitos de fome e apetite são distintos. O apetite se caracteriza por uma ânsia a um determinado alimento (HILL et al, 1984). Já a fome é a necessidade homeostática de comer (LUTTER; NESTLER 2009). Desse modo, o comportamento

e ricos em lipídios e carboidratos. Isso ocorre na fase adulta de ambos os sexos e independe do ciclo circadiano do animal (SOUZA, 2018). Quando a separação materna foi somada a outro estressor, o maior consumo de alimento palatável se manteve, além de haver uma diminuição da ingestão da dieta padrão juntamente a uma perda de peso corporal (SOUZA, 2020a). Antecipação da saciedade também foi observada em animais que sofreram separação materna (SOUZA, 2020b).

2.6 Sistema hedônico e abuso de drogas

No entanto, o controle hedônico também é responsável por outros efeitos além do querer e gostar dos alimentos, pois as vias neuronais hedônicas que causam o prazer alimentar são as mesmas que desencadeiam a sensação de estar drogado quando se consome drogas (NESTLER, 2005). Estruturas como o Nac e a VTA são de suma importância para o efeito agudo de recompensa do abuso de drogas. Vários estimulantes atuam no Nc, tanto diretamente como indiretamente, aumentando a expressão de neurotransmissores responsáveis pela sensação de prazer como a dopamina. Os opioides realizam esse feito quando inibem os receptores gabaérgicos na VTA, que conseqüentemente ativa os neurônios dopaminérgicos também na VTA. Os opioides também atuam diretamente nos receptores opioides do Nac. O álcool inibe os receptores de GABA e acaba por ativar os neurônios de dopamina no VTA da mesma maneira que os opioides fazem (NESTLER, 2005). (Figura: 4)

Figura 4 - Esquema simplificado da convergência de ações de quais as drogas realizam no Nac e VTA.



Fonte: Figura retirada do artigo: “*Is there a common molecular pathway for addiction?*”
Nestler, Nature Neuroscience, volume 8, 2005.

Portanto, é evidente que ao afetar o sistema hedônico, a separação materna, também cause problemas em relação ao abuso de drogas, devido ao fato de os entorpecentes e alimentos compartilharem as mesmas vias de recompensa. Pois já foram observadas injúrias ao funcionamento do comportamento hedônico alimentar induzidos por separação materna (SOUZA, 2020a; SOUZA, 2020b; SOUZA, 2018; SILVA, 2014).

Nessa conjuntura, não é de se estranhar que a separação materna aumente a sensibilidade a cocaína em ratos, mesmo que em baixas concentrações (KIKUSUI, 2005). Assim como eleva a autoadministração de metanfetamina em animais separados (LEWIS, 2013). Foi visto também que o consumo de álcool é aumentado em ratos que foram afastados da genitora, tanto em adultos (LEICHTWEIS, 2020; DAOURA, 2011), como em adolescentes (THOMPSON, 2020; DAOURA, 2011). Alterações nos sistemas dopaminérgico e endocanabinoidérgico causados por separação materna podem ser responsáveis pelo comportamento de busca e potencial vulnerabilidade a outras drogas em ratos (ROMANO-LOPEZ et al, 2016). Em relação aos opioides, roedores separados das mães apresentavam grande risco de desenvolver dependência a morfina na vida adulta (VAZQUEZ et al, 2005). Como também tinham uma maior preferência a por ela quando ela era ofertada junto com outras drogas (VAZQUEZ et al, 2006).

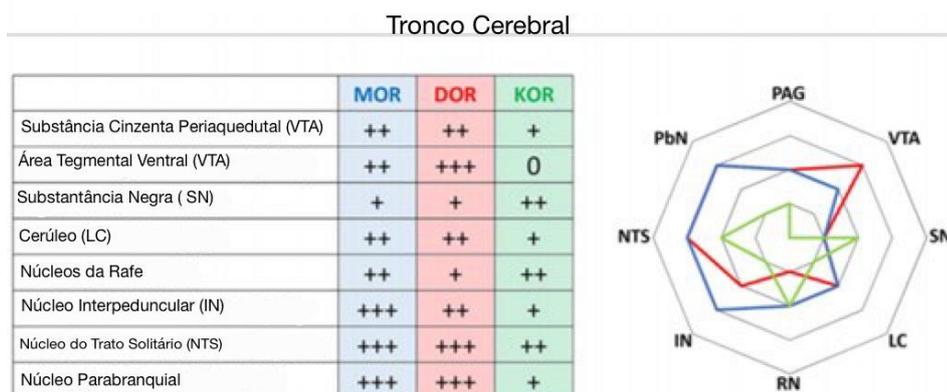
Dessa forma, são perceptíveis as consequências que a separação materna e todo o estresse no período de lactação podem trazer para sociedade no aspecto de abuso de drogas. Prova disso foram os 8,5 milhões de euros gastos no total em hospitais de 24 países europeus para o tratamento de transtornos relacionados ao álcool e drogas entre 2013 e 2015 (CASAL, 2020). Logo, mais uma vez a importância de estudos que investigam o estresse no início da vida é evidente.

2.7 Sistema opioidérgico

De fato, os opioides são capazes de alterar funções fisiológicas e comportamentais. Tanto que são utilizados para tratar dor, induzir o sono e causar euforia (ROCCHI et al, 2020). O sistema opioidérgico também se apresenta como um dos principais integrantes de diversos transtornos psiquiátricos, no qual destaca-se o sistema endorfinérgico, que atua em respostas a drogas opioidérgicas como a morfina. A disfunção do sistema das endorfinas está envolvida em eventos de transtornos afetivos e de personalidade, assim como estresses pós traumáticos e esquizofrenia. (ROCCHI et al, 2020; SAVIC et al, 2015; TUOMINEN et al, 2012; PROSSIN et al, 2010; LOVE et al, 2009; BECERRA et al, 2006; ZUBIETA et al, 1999; SCHMAUSS, EMRICH, 1985; SHAH, DONALD 1982).

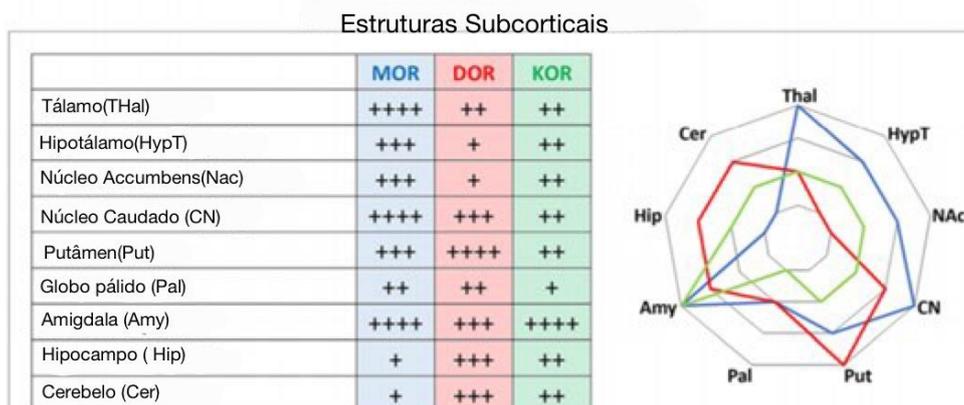
Nesse âmbito, o sistema opioidérgico apresenta três principais receptores, μ (MOR), δ (DOR) e κ (KOR). Eles são distribuídos de maneira diferente através do cérebro (ROCCHI et al, 2020), no qual os receptores MOR, principais reguladores do sistema de recompensa via estimulação por drogas e alimentos palatáveis (PECIÑA, BERRIDGE, 2000; EVANS, VACCARINO, 1990), são mais expressos na amígdala, gânglios da base, tálamo e hipotálamo (HIRVONEN et al, 2009; FROST et al, 1985). No entanto, também é possível encontrar receptores MOR na VTA (NESTLER, 2005) (Figuras: 5 e 6). Eles provocam uma liberação de dopamina na via mesolímbica, já que os neurônios GABAérgicos que bloqueavam os neurônios dopaminérgicos passam a ser inibidos quando o MOR é expresso (NESTLER, 2005; PECKYS, LANDWEHRMEYER, 1999).

Figura 5 - Distribuição dos receptores opioidérgicos no tronco cerebral.



Fonte: Figura retirada do artigo: “*Opioidergic System and Functional Architecture of Intrinsic Brain Activity: Implications for Psychiatric Disorders*”, Rocchi et al, The Neuroscientist, 2020.

Figura 6 - Distribuição dos receptores opioidérgicos nas estruturas subcorticais do cérebro.



Fonte: Figura retirada do artigo: “*Opioidergic System and Functional Architecture of Intrinsic Brain Activity: Implications for Psychiatric Disorders*”, Roochi et al, The Neuroscientist, 2020.

Por sua vez, os neurônios POMC, caracterizam-se por serem precursores do principal componente das endorfinas, ou seja, a β -endorfina. Nesse contexto, uma das maiores populações de POMC é encontrada no núcleo arqueado. Ademais, o arqueado faz conexões com regiões límbicas que também estão associadas a vias das recompensas como o Nac. (ROCCHI et al, 2020; LE MERRER et al, 2009; BERNSTEIN et al, 2002; CASTRO, MORRISON, 1997; PILCHER et al, 1988; KHACHUTURIAN et al, 1984; HERZ et al, 1982). A β -endorfina mostra-se de grande importância quando ela interfere no comportamento alimentar através do MOR (BODNAR; KLEIN, 2004). Nesse âmbito, pelo fato de existir uma grande quantidade de POMC no ARC, a mesma é expressa nessa região (BODNAR; KLEIN, 2004). Sabe-se também que a β -endorfina, além de estar envolvida no consumo de alimentos, pode regular o humor (ANDERSON et al., 2016). Por outro lado, o NPY, também é tido como um integrante importante no controle da ingestão alimentar quanto a sua relação com o sistema opioidérgico, visto que, suas concentrações foram aumentadas no núcleo dorsomedial do hipotálamo de ratos tratados com antagonistas opioidérgicos (LAMBERT; et al, 1994).

2.8 Sistema opioidérgico, separação materna e comportamento alimentar

Realmente, o sistema opioidérgico é bastante atuante no controle do comportamento alimentar, pois foi visto que a ação de agonistas opioides em regiões cerebrais hedônicas como o Nac foram capazes de aumentar a motivação por um

alimento. (GIULIANO; COTTONE, 2015; ZHANG; BALMADRID; KELLEY, 2003). Da mesma forma que antagonistas de MOR inibem a preferência por soluções açucaradas (LE MAGNEN et al., 1980). Nesse âmbito, a estimulação dos receptores MOR e DOR provocam um maior desejo de comer. Além disso, o receptor MOR é o único entre os opioides que amplifica as reações de motivação e incentivo perante um alimento, ou seja, o 'querer' hedônico (GIULIANO; COTTONE, 2015). É visto também que, animais no qual o gene referente ao receptor MOR sofreu exclusão genética, apresentaram uma menor ingestão de soluções doces em uma hora de experimento, como também em todos os dias de análise (AWAD et al, 2020).

A projeção existente entre o Nac e o hipotálamo, mais precisamente o hipotálamo lateral, foi objeto de estudo no qual procurou-se averiguar a modulação do comportamento alimentar em relação à palatabilidade. Logo, foi visto que a estimulação do MOR no hipotálamo previne o declínio da ingestão de alimentos provocados pela saciedade (TANDOM; KEEFE; TAHA, 2017). A utilização de agonistas do MOR, como a morfina e o DAMGO, no septo lateral promoveram de forma significativa um aumento no comportamento alimentar de ratos. Em contrapartida, agonistas dos receptores DOR e KOR não surtiram efeito (CALDERWOOD; TSENG; GLENN, 2020). Vale ressaltar que o septo lateral também apresenta conexões com o hipotálamo (KOROTKOVA; PONOMARENKO, 2017).

Ademais, ratas mostraram uma maior expressão do receptor MOR em regiões hedônicas como o núcleo estriado quando foram expostas de forma limitada e irregular ao chocolate (HEAL; et al, 2017). Assim como ratas que sofreram separação materna apresentaram maiores níveis de peptídeos opioides em regiões como o hipotálamo, no qual se reitera a evidencia de diferença nas consequências do estresse materno em relação ao sexo (GUSTAFSSON; et al, 2005). Por outro lado, estudos em humanos mostraram que a administração de agonistas opioides causaram um aumento no consumo de alimentos palatáveis (YEOMANS; GRAY, 2002).

Dessa forma, o presente estudo propõe-se investigar as consequências que um estresse causado no início da vida pode provocar em relação ao comportamento alimentar hedônico de ratos jovens de ambos os sexos, no quesito que engloba o sistema opioidérgico. Comportamento hedônico esse responsável pelas sensações de prazer e que compartilha as mesmas vias neurais que correspondem ao consumo de drogas. No qual gastos governamentais e danos à saúde se caracterizam como

alguns dos malefícios acarretados pelo consumo de drogas. Assim como a depressão e obesidade, juntamente causadas pelo estresse precoce após o nascimento. Portanto é de suma importância compreender mais ainda todo esse mecanismo e suas consequências.

3 HIPÓTESE

O estresse por separação materna aumenta o consumo de alimento palatável após estresse alimentar agudo e a expressão gênica do receptor opioidérgico μ (MOR) no hipotálamo de ratos *wistar* jovens de ambos os sexos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da separação materna sobre a ingestão de alimento palatável antes e após estresse alimentar agudo e sobre a expressão gênica do receptor opioidérgico μ (MOR) no tronco encefálico de ratos *wistar* jovens de ambos os sexos.

4.2 Objetivos específicos

Em ratos *wistar* jovens, machos e fêmeas, separados ou não, avaliar:

- A evolução ponderal;
- A ingestão de alimento palatável aos 35 dias de vida;
- A ingestão de alimento palatável após estresse alimentar agudo aos 35 dias de vida;
- A expressão gênica do receptor opioidérgico μ no tronco encefálico antes e após exposição ao estresse alimentar agudo.

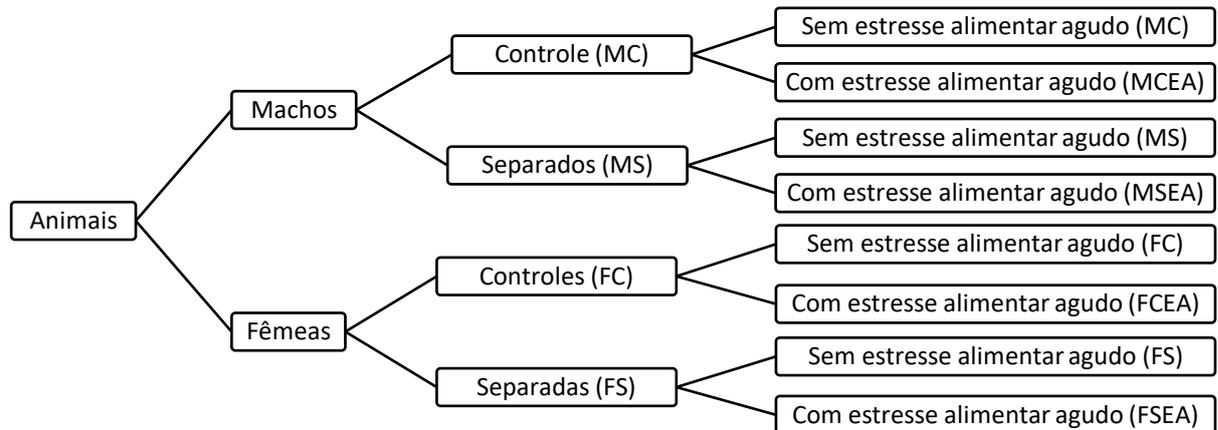
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* albinos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As fêmeas nulíparas e primíparas com peso entre 250 e 300 g foram mantidas em Biotério de experimentação no Departamento de Anatomia da UFPE com temperatura de 22° C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), Ciclo claro/escuro de 12-12h invertido (com luzes acesas às 18h) e livre acesso à água e à dieta padrão do biotério (Presence®). O manejo e os cuidados seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº0009/2018). Após adaptação foram realizados acasalamentos na proporção de duas fêmeas para um macho. Após um período de sete dias junto com o macho, as fêmeas foram acomodadas em gaiolas individuais onde permaneceram com livre acesso à água e dieta, o peso corporal foi acompanhado para a confirmação da gestação. O dia de nascimento dos filhotes foi considerado o dia 0, sendo a manipulação para redução da ninhada realizada no 1° dia de vida. Posteriormente, as ninhadas ficaram constituídas por oito ratos, sendo esses machos e fêmeas, no qual houve o cuidado de não permitir um número menor que dois representantes do sexo oposto ao dominante.

5.2 Separação materna e formação dos grupos experimentais

Os grupos experimentais foram definidos de acordo com a presença ou não da separação materna, designando dois grandes grupos de animais: controles e aqueles que passaram pela separação materna. Desses dois grandes grupos, foram formados mais dois subgrupos: aqueles que submetidos a estresse alimentar agudo ou não, totalizando 8 grupos. Sendo representados desta maneira:



A separação materna iniciou-se no segundo dia pós-natal (PND2), das 8h às 11h, totalizando 180min por sessão, se estendendo até o PND14 (SOUZA, 2020a; SOUZA, 2020b; SOUZA, 2018; SILVA, 2014). Os filhotes foram mantidos em incubadoras com temperatura controlada de 30-32°C (Plotsky et al 1993). O grupo controle foi constituído por ninhadas que não foram manipuladas, exceto para a limpeza das gaiolas. Foram desmamados no PND21. Após o desmame, os animais foram agrupados em gaiolas e separados por sexo, com dois a três animais em cada gaiola até o início dos testes.

5.3 Ingestão de alimento palatável

No 35º dia de vida foi realizada a ingestão de alimento palatável. Ofertou-se um alimento palatável (Cookie Chocolate Bauducco®), a fim de averiguar quanto seria consumido pelos animais durante o período de 1h. A ingestão alimentar (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada após esse período (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998).

5.4 Ingestão de alimento palatável após estresse alimentar agudo

No 35º dia de vida foi realizado o estresse alimentar agudo. Este consistia da exposição visual e olfativa do animal a um alimento palatável (Cookie Chocolate Bauducco®) envolvido por uma rede metálica que impedia que o animal tivesse acesso ao alimento, durante 30min. Após esse período os animais tiveram acesso ao cookie por 1h. A ingestão alimentar (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada após o período de 1h.

5.5 Análise da expressão gênica do receptor opioidérgico μ no tronco encefálico.

5.5.1. Eutanásia e obtenção do hipotálamo

A eutanásia foi realizada na fase escura (12h) por decapitação em guilhotina com um grupo sem estresse e outro que experimentou 20 min de estresse alimentar imediatamente antes da decapitação. A cabeça foi dissecada e o crânio aberto para retirada do encéfalo. Ele foi dissecado para obtenção do hipotálamo, acondicionado em tubo plástico apropriado (ependorf) e imediatamente acondicionado em freezer a -20°C até o momento das análises.

5.5.2. Análise da expressão gênica

Os troncos encefálicos foram processados para análise da expressão gênica do receptor μ opioide pelo método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O experimento de PCR em tempo real foi realizado com as amostras seguindo as etapas descritas resumidamente a seguir. O método consiste em três etapas: 1) Extração do RNA Total; 2) Conversão do RNA em cDNA e 3) Amplificação da reação em cadeia da polimerase. O RNA total foi extraído utilizando 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) com um homogeneizador (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen® e, subsequentemente, a quantidade e qualidade do RNA purificado foram avaliadas utilizando-se o espectrofotômetro, NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com solução de gDNA Wipeout (Qiagen®, Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a

contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42°C, e armazenadas em gelo. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa de 2,0 microgramas de RNA purificado em cDNA, utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen®, Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min. A enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20°C até a sua utilização.

Posteriormente, 5 µl de cada amostra diluída de cDNA foi utilizada como template para a amplificação por PCR em tempo real, utilizando SYBR Green (Qiagen®, Hilden, Alemanha), como fluoróforo intercalante. Utilizou-se o sistema de detecção de PCR em tempo real: Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen®, Hilden, Alemanha). Os parâmetros do PCR foram: o primeiro passo de desnaturação inicial de 5 min a 95°C seguido de 45 ciclos de 5s a 95°C, e 10s a 60°C.

5.6 Análise estatística

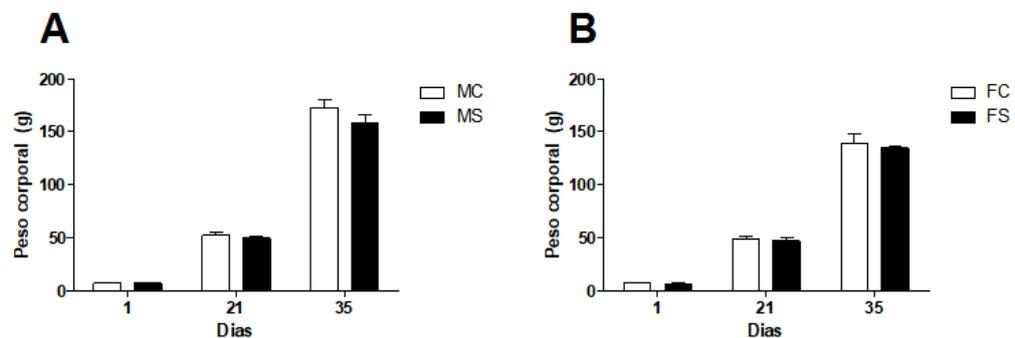
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para comparações múltiplas, foi utilizada ANOVA One Way ou Two Way, seguida do pós-teste de *Bonferroni*, adotando níveis de significância como $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Graphpadprism.

6 RESULTADOS

6.1 Evolução ponderal

Não houve diferença de peso corporal entre animais controle e separados, tanto machos quanto fêmeas, em nenhuma das idades analisadas (Figura 7).

Figura 7 - Efeitos da separação materna sobre a evolução ponderal ao nascimento, desmame (21 dias) e pós-desmame (35 dias).



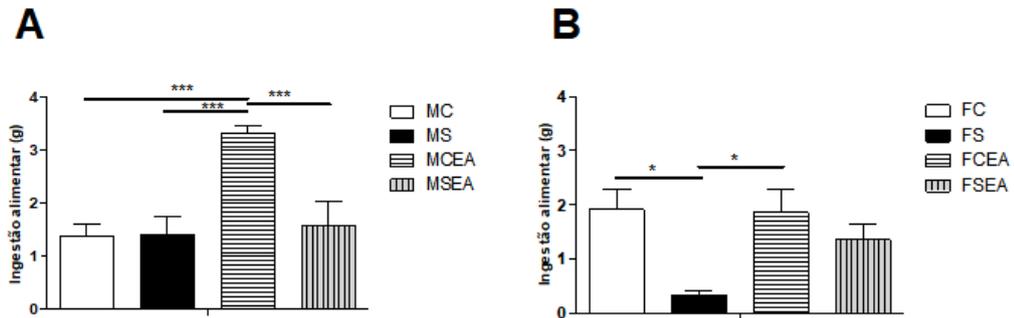
Fonte: O autor, 2020.

Legenda: MC: Machos controle; MS: Machos separados; FC: Fêmeas controle; FS: Fêmeas separadas. ANOVA Two Way. Pós-teste de Bonferroni. Dados apresentados em média e erro padrão na média N de machos=8-10. N de fêmeas=6-10.

6.2 Ingestão alimentar antes e após estresse alimentar agudo

A separação materna durante a lactação diminuiu a ingestão de alimento palatável em fêmeas comparadas ao grupo controle (C: $1,94 \pm 0,6$ vs S: $0,33 \pm 0,1$, $p < 0,05$) (Figura 2B). Em machos, observou-se que o grupo controle que sofreu estresse agudo consumiu mais alimento palatável que os demais (Figura 2A). A exposição ao estresse alimentar agudo aos 35 dias não alterou a ingestão de alimento palatável em animais separados comparados aos controles em ambos os sexos (Figuras 2A e 2B). No entanto, a análise intragrupo demonstrou que os machos controles aumentaram a ingestão de alimento palatável após estresse agudo quando comparados à ingestão sem o estresse alimentar (MC: $1,65 \pm 0,35$ vs MCEA: $3,24 \pm 0,4$, $p < 0,05$). (Figura 8A) enquanto que as fêmeas não demonstraram alteração após experimentarem o estresse agudo (Figura 8B).

Figura 8 - Efeitos da separação materna sobre a ingestão de alimento palatável antes e após o estresse alimentar agudo.



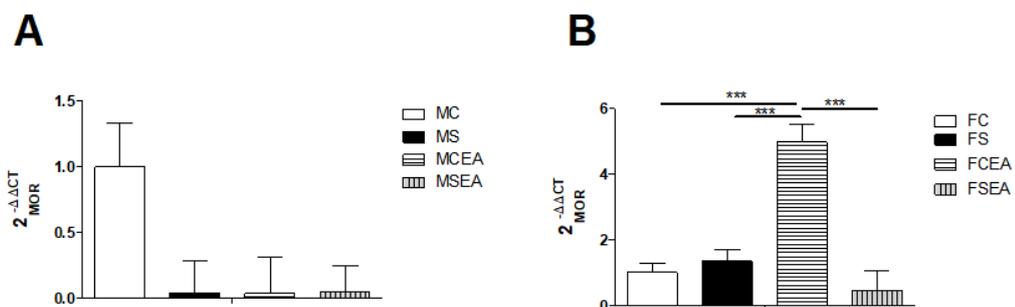
Fonte: O autor, 2020.

Legenda: MC: Machos controle; MS: Machos separados; MCEA: Machos controle com estresse agudo; MSEA: Machos separados com estresse agudo; FC: Fêmeas controles; FS: Fêmeas separadas; FCEA: Fêmeas controle com estresse agudo; FSEA: Fêmeas separadas com estresse agudo; ANOVA One Way. Pós-teste de Bonferroni. Dados apresentados em média e erro padrão da média. N de machos=8-10. N de fêmeas=6-10. *vs MC ou FC; # vs MS ou FS. * e # = $p < 0,05$; ## = $p < 0,01$.

6.2 Expressão do receptor opioidérgico MOR no hipotálamo

A separação materna durante a lactação não promoveu a expressão do receptor MOR, mesmo após um evento de estresse agudo em machos e fêmeas (FIGURAS 9A E 9B). Assim como em animais controles machos e fêmeas (FIGURAS 9A e 9B), incluindo aqueles que também sofreram estresse agudo, com exceção das fêmeas (FIGURA 9B).

Figura 9 - Efeitos da separação materna sobre a expressão do receptor opioidérgico MOR em animais que sofreram ou não estresse agudo.



Fonte: O autor, 2020.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo comprovou que a separação materna, ou seja, a exposição do animal a um estresse crônico durante o período de lactação, não provocou alterações do peso corporal de ratos e ratas *wistar* jovens. No entanto, essa adversidade no início da vida mostrou-se capaz de alterar o comportamento alimentar hedônico das fêmeas. Isso é demonstrado pela baixa ingestão de alimentos palatáveis. Entretanto, o mesmo parece não ocorrer em relação aos machos, visto que, seu comportamento perante uma comida palatável não surtiu efeito algum, igualando-se àqueles isentos de estresse crônico na lactação. Já sobre a expressão do receptor opioidérgico MOR, a separação materna não foi capaz de aumentar sua expressão de forma significativa em tecidos hipotalâmicos. Entretanto, o evento de estresse agudo sofrido por grupos controles, por sua vez, expressaram o MOR em abundância, como nas fêmeas.

Em relação aos achados do peso corporal, os resultados corroboram com os de outros autores que também não observaram oscilações de peso em ratos jovens separados na lactação (STONHER; et al, 2020; LEE; et al,2014; ZIMMERBERG; SAGESER, 2011; RYU; et al, 2009). Uma das razões para isso acontecer poderia ser explicada pelo fato de animais jovens apresentarem um alto metabolismo, que por consequência, favorece a permanência da massa magra e o consumo das reservas lipídicas corporais (STONHER; et al, 2020; TSCHOPM, 2001). Dado que ratos mais jovens possuem um metabolismo completamente diferentes dos ratos mais velhos (TSCHOPM, 2001). Sabe-se que a mitocôndria está envolvida nos processos de homeostase energética e metabolismo (DENG, 2019). Nessa conjuntura, ratos envelhecidos apresentam uma elevada mitofagia, ou seja, remoção seletiva de mitocôndrias (NO, M. 2020). Logo, o maior número de mitocôndrias em ratos juvenis pode explicar o alto metabolismo e pré-disposição a manutenção da massa magra nesses animais, além da maior demanda energética através dos lipídios. Ademais, mesmo que a separação materna submeta o animal a um jejum forçado de três horas durante duas semanas do período de lactação, de fato, a mãe intensifica seus cuidados quando a prole retorna a ela. Estudos mostram que apesar das atividades maternas serem menores nos primeiros episódios de separação, a genitora aumenta significativamente suas ações maternas na tentativa de compensar os baixos níveis

de assistência realizados pelas mesmas nas primeiras sessões do estresse (ORSO; et al, 2018). Nesse contexto, os atos de lambar e amamentar os filhotes se caracterizam como aqueles que foram aumentados em decorrência do experimento de separação (MACRI; et al, 2004). Assim, pode-se sugerir que esse comportamento compensatório pode estar a mitigar os efeitos da separação materna em relação ao ganho de peso corporal de ratos *wistar* de ambos os sexos jovens. No entanto, a simples análise do peso não permite descartar impacto da separação materna sobre parâmetros que influenciam o peso corporal, como a taxa metabólica e estudos com esse fim são necessários.

Sobre os efeitos da separação no comportamento alimentar hedônico, foi observado que, em fêmeas, o consumo de alimentos palatáveis foi diminuído em comparação com os machos. Esses dados mostram que a separação materna afeta negativamente o sistema hedônico de fêmeas, fazendo-as não se sentirem motivadas perante substâncias prazerosas. Nesse contexto, algo semelhante foi encontrado por (LEICHTWEIS; et al, 2019), no qual percebeu-se que ratas adolescentes separadas das mães no período de lactação não mostraram interesse no consumo de álcool. Ademais, na vida adulta, os achados de (SOUZA; et al, 2020b) mostram que ratas maduras apresentam uma antecipação da saciedade, demonstrada por uma curta refeição e menor ingestão de alimentos considerados padrão. (MIRAGAIA, 2018) e (MICHAELS; HOLTZMAN, 2006), observaram que fêmeas separadas consumiam menos sacarose quando comparadas aos machos e se sentiam menos motivadas para consumi-las, respectivamente. Nesse âmbito, a sacarose é utilizada para medir a capacidade dos animais em se engajarem em atividades que proporcionem prazer.

Portanto, pode-se inferir que as fêmeas separadas na lactação tendem a desenvolver anedonia. Pois um animal anedônico é aquele que apresenta dificuldades ou incapacidade de sentir prazer. Nesse âmbito, um estudo com ratas adolescentes exibiu uma tendência ($p=0,05$) num quadro de diminuição de ingestão de sacarose no teste comportamental de ingestão desta. No qual acabou por ser discutida como demonstração de anedonia nessas fêmeas. Aliás, as rodentias também apresentaram uma resposta mais inata à anedonia quando mostraram uma maior latência para se aproximarem da solução doce (GOODWILL, 2019).

De fato, a anedonia é associada ao estado depressivo do ser vivo. Dessa forma, o estresse no período inicial da vida coopera para a psicopatologia da depressão.

Nesse contexto, apenas ratas fêmeas que passaram por eventos estressantes no início da vida exibiram comportamentos relacionados a depressão (SICKMANN, 2015). Além disso, segundo (HOUWING, 2019), as mulheres possuem duas vezes mais chances de desenvolverem depressão quando comparadas aos homens. Assim, é possível sugerir que nesse trabalho as fêmeas se mostrem mais vulneráveis à anedonia, que por sua vez estaria associada ao humor depressivo, do que os machos, uma vez que apenas elas diminuíram a ingestão de um alimento palatável, ou seja, uma atividade prazerosa.

Por outro lado, em relação aos machos, outros estudos também mostraram que o comportamento alimentar hedônico de ratos jovens não se alterou por conta da separação materna. Como é o caso de (SOUZA; et al, 2020a), no qual ratos machos juvenis não apresentaram diferenças significativas no consumo de dieta palatável durante a fase escura do ciclo, além do trabalho de (MICHAELS; HOLTZMAN, 2006) que não mostrou alteração perante o consumo de sacarose. Isso pode acontecer devido ao fato de o estresse precoce causar efeitos que dependem do sexo. Pois trabalhos como o de (BONDAR, LEPESHKO, RESHETNIKOV; 2018) mostraram que ratas que sofreram separação materna apresentam um maior quadro de ansiedade quando comparadas a machos que passaram pelo mesmo estresse no período de lactação. Dessa maneira, os machos seriam menos ansiosos, logo o eixo HPA desses animais não estaria muito alterado, resultando em poucas mudanças no comportamento hedônico

Percebe-se também nesse trabalho que, animais machos controles, consumiram mais alimentos palatáveis após um evento de estresse agudo. Esse achado corrobora com o também encontrado por (THOMPSON; SIMMONS; MCMURRAY, 2020), no qual, animais machos controles, que passaram por períodos estressantes, aumentaram a ingestão de substâncias hedônicas como o álcool. (THOMPSON; SIMMONS; MCMURRAY, 2020) também mostrou que, animais que sofreram separação materna e estresse na adolescência, não apresentaram um consumo significativo de elementos hedônicos, assim como os animais estressados precocemente e na fase juvenil desse estudo. Alguns estudos mostram que um estressor pode promover uma resiliência a um estressor futuro (THOMPSON; SIMMONS; MCMURRAY, 2020; COTELLA; et al, 2019). Logo, pode-se sugerir que a separação materna interferiu na ação que o estresse agudo poderia provocar no

consumo do alimento palatável pelo animal, no entanto, assim como (THOMPSON; SIMMONS; MCMURRAY, 2020; COTELLA; et al, 2019), não é possível determinar isso apenas com esses dados. como (THOMPSON; SIMMONS; MCMURRAY, 2020; COTELLA; et al, 2019) também sugere que a combinação de estresses pode afetar uma série de processos relacionados ao comportamento hedônico, porém, mais estudos são necessários para comprovar essa afirmação.

De outro modo, fêmeas expostas a um estresse alimentar de exposição visual a um alimento palatável por 15 minutos, ou seja, estresse agudo alimentar, não aumentaram o consumo desse alimento palatável (MICIONE DI BONAVENTURA; et al, 2014). Logo, esses resultados se mostram de acordo com os desse presente trabalho, que também mostrou que fêmeas jovens submetidas a um estresse agudo alimentar não apresentaram consumo significativo de uma refeição palatável. Portanto, percebe-se que o estresse agudo não alterou a ingestão alimentar dessas fêmeas, da mesma maneira que não modificou o consumo nas ratas separadas. As ratas separadas já apresentavam uma baixa ingestão, no entanto, o estresse agudo não foi capaz de modificar esse quadro, no qual constatou-se da mesma maneira um baixo consumo alimentar.

Sobre a expressão opiodérgica do MOR, a quantidade presente do receptor em tecidos hipotalâmicos de animais controles machos não foi exarcebada, tenham eles sofrido estresse agudo ou não, assim como os ratos separados. Esses dados estão de acordo com os achados de (YAMAMOTO; et al, 2003), no qual se observou que animais que eram submetidos a um único estresse agudo de restrição, onde foram envolvidos em uma rede metálica por quatro horas e conseqüentemente impossibilitados de ser mexer, expressaram de forma semelhante aos controles o receptor opiodérgico MOR. Portanto, percebe-se que não foi observada uma relação entre a expressão do receptor MOR no hipotálamo e o consumo alimentar. Ademais, (CHANG; et al, 2018) mostra que eventos adversos no início da vida não foram capazes de promover alterações na expressão de opioides, como o MOR, em ratos machos juvenis. Além do mais, mesmo que a expressão do MOR no hipotálamo não seja abundante, (YAMAMOTO; et al, 2003) destaca que o estresse agudo promove uma super expressão de MOR em outras regiões encefálicas como o mesencéfalo. Portanto, outros territórios cerebrais tendem ser sensíveis ao curto evento de estresse

e por consequência expressarem o MOR e esse por ventura provocar alterações comportamentais alimentares.

Em contrapartida, as ratas controles que sofreram estresse agudo, apresentaram uma expressão significativa do MOR no hipotálamo. No entanto, o mesmo não ocorreu em relação a ingestão de um alimento palatável. Segundo (AWAD et al, 2020), fêmeas que foram submetidas a um acesso limitado de sacarina, ou seja, uma substância 200 vezes mais doce que a sacarose, consumiram mais alimentos do que aqueles com acesso limitado e contínuo a sacarose. (AWAD et al, 2020) também comenta que a compulsão por sacarina não depende da presença ou ausência de MOR, mas sim de uma possível diferença sexual, devido ao fato de as fêmeas ingerirem significativamente mais sacarina que os machos nos primeiros momentos das sessões comportamentais. Desse modo, a expressão de MOR no hipotálamo de ratas controles com estresse agudo não provocaria um consumo de um alimento palatável assim como ocorreu neste trabalho.

Sendo assim, reforçam-se as evidências que a separação materna é capaz de alterar o comportamento hedônico de fêmeas jovens. Os resultados mostram que o estado depressivo que pode ser causado pelo evento de separação materna (VETULANI, 2013) é responsável por provocar a anedonia, que prejudica o correto funcionamento do comportamento alimentar nas ratas. Assim como o estresse agudo em ratos machos jovens é capaz de promover a ingestão de alimentos não nutritivos e que podem causar uma série de enfermidades ao organismo. No qual se evidencia mais uma vez as consequências que o estresse, tão presente na sociedade contemporânea, pode acarretar a um indivíduo. O fato de o receptor MOR não ter se demonstrado como vital para o desenvolvimento dos resultados pode ser explicado pela dualidade que o mesmo pode provocar em determinadas situações já descritas na literatura, pois ele pode tanto atenuar como promover respostas positivas e negativas em sistemas neurais responsáveis pelo prazer (MALLIK; CHANDA; LEVITIN, 2017). Por isso, esse trabalho não descarta que podem haver interferências positivas mediadas pelo MOR no comportamento alimentar hedônico de ratos que sofreram estresse no período de lactação.

8 CONCLUSÃO

A separação materna durante a lactação promove ajustes do comportamento alimentar hedônico em fêmeas. No entanto, não provocou diferenças significativas no comportamento alimentar hedônico dos machos. Assim como alterações no peso corporal de ambos os sexos. Por sua vez, o estresse agudo tem influência na modulação do comportamento alimentar hedônico apenas em machos jovens, como também na indução da expressão do receptor MOR apenas em fêmeas.

REFERÊNCIAS

AISA, B. et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. **Psychoneuroendocrinology**, 32, 256–266, 2007.

AMALIYA S, RUSTINA Y, AGUSTINI N. Comparison of Various Kangaroo Mother Care Carriers on Maternal Comfort: A Pilot Study. **Compr Child Adolesc Nurs.** 2017;40(sup1):52-61.

ANDERSEN, S.L. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 27, 3–18, 2003.

ANDERSEN, S.L., & TEICHER, M.H. Desperately driven and no brakes: Developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 33, 516–524, 2009.

ANDERSON, E. J. P. et al. Regulation of feeding and energy homeostasis by -MSH. **Journal of Molecular Endocrinology**, 157–174, 2016.

AWAD, G. ROECKELI, L.; MASSOTTE, D.; OLMSTEAD, M. C.; Befort, Katia Deletion of mu opioid receptors reduces palatable solution intake in a mouse model of binge eating, **Behavioural Pharmacology**: 31, 249-255, 2020.

A.C. SHIN, P.J. PISTELL, C.B. PHIFER, H.R. BERTHOUD, Reversible suppression of food reward behavior by chronic mu-opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens. **Neuroscience**, 2010.

BASKIN, D. G. et al. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. **Brain Res**, v. 848, n. 1-2, p. 114-23, 1999.

BRITT, J.P., MCGEHEE, D.S. Presynaptic opioid and nicotinic receptor modulation of dopamine overflow in the nucleus accumbens. **J Neurosci** 28, 1672-1681, 2008.

BODNAR, R. J.; KLEIN, G. E. Endogenous opiates and behavior, **2003Peptides**, 2004.

BERTHOUD, H. R. Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. **Physiology and Behavior**, v. 91, n. 5, p. 486–498, 2007.

BECERRA L, Harter K, Gonzalez RG, Borsook D. Functional magnetic resonance imaging measures of the effects of morphine on central nervous system circuitry in opioid-naïve healthy volunteers. **Anesth Analg** 103(1):208–16, 2006

BOHN, M. C. Glucocorticoid-induced teratologies of the nervous system. In J. Yanai (Ed.), **Neurobehavioral teratology**, 365-387, 1984.

BLUNDELL, J. E.; HILL, A. J. Serotonergic modulation of the pattern of eating and the profile of hunger-satiety in humans. **Int J Obes**, v. 11 Suppl 3, p. 141-55, 1987

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

BERRIDGE K. C. Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2000.

BAILOO JD, JORDAN RL, GARZA XJ, TYLER AN. Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. **Developmental Psychobiology**. Pages 674-685, 2014.

BHANSALI, DUNNING, SINGER, DAVID, & SCHMAUSS. Early life stress alters adult serotonin 2C receptor pre-mRNA editing and expression of the alpha subunit of the heterotrimeric G-protein G q. **J Neurosci**. Feb 7;27(6):1467-73, 2007.

BARRETT, J.; FLEMING, A. S. Annual research review: All mothers are not created equal: neural and psychobiological perspectives on mothering and the importance of individual differences. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 52, n. 4, p. 368–397, 2011.

BONDAR, N.P; LEPESHKO A. A; RESHETNIKOV V. V. Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. **Behav Neurol**, 2018.

CASAL, B., Storti, C. C., & Morgan, D. Expenditure on the treatment of drug and alcohol disorders in hospitals: How much and what explain it? **International Journal of Drug Policy**, 79, 102750, 2020.

CRADDOCKTJA, Fritsch P, Rice MA Jr, del Rosario RM, Miller DB, et al. A Role for Homeostatic Drive in the Perpetuation of Complex Chronic Illness: Gulf War Illness and Chronic Fatigue Syndrome. **PLoS ONE** 9(1): e84839, 2014.

COTELLA, E.M., A.S. Gómez, P. Lemen, C. Chen, G. Fernández, C. Hansen, J.P. Herman, M.G. Paglini, Long-term impact of chronic variable stress in adolescence versus adulthood, *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, 303–310, 2019

CUI Y, Cao K, Lin H, et al. Early-Life Stress Induces Depression-Like Behavior and Synaptic-Plasticity Changes in a Maternal Separation Rat Model: Gender Difference and Metabolomics Study. **Front Pharmacol.** 2020

CHANG, L., Kigar, S. L., Ho, J. H., Cuarenta, A., Gunderson, H. C., Baldo, B. A., ... Auger, A. P. Early life stress alters opioid receptor mRNA levels within the nucleus accumbens in a sex-dependent manner. **Brain Research**, 1710, 102–108, 2019.

CALDERWOOD, M. T., Tseng, A., & Glenn Stanley, B. Lateral Septum Mu Opioid Receptors in Stimulation of Feeding. **Brain Research**, 146648, 2000.

CONDE-AGUDELO, A.; BELIZAN, J. M.; DIAZ-ROSSELLO, J. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. **Cochrane Database Syst Rev.** (3):CD002771, 2011.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY M. J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biol Psychiatry.** v.48, n.12, p.1164-74, 2000.

COPLAN, J. D. et al. Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 93, 1619–1623, 1996.

COTTONE P, SABINO V, STEARDO L, ZORRILLA EP: Opioid-dependent anticipatory negative contrast and binge-like eating in rats with limited access to highly preferred food. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:524–535. 44 Waller DA, Kiser RS, Hardy BW, Fuchs I, Feigenbaum LP, Uauy R: Eating behavior and plasma beta-endorphin in bulimia. **Am J Clin Nutr** ;44:20–23, 2011.

COMASCO E, Todkar A, Granholm L, Nilsson KW, Nylander I. Alpha 2a-Adrenoceptor Gene Expression and Early Life Stress-Mediated Propensity to Alcohol Drinking in Outbred Rats. **Int J Environ Res Public Health.**12(7):7154-7171, 2015.

COREY B. et al. Opioid receptor modulation of neural circuits in depression: What can be learned from preclinical data?. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. Volume 108, Pages 658-678, 2020.

DAMIANI D, DAMIANI D. Sinalização cerebral do apetite. **Rev Bras Clin Med.**; 9(2): 138-145, 2011.

DE KLOET, E. R. et al. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews**, 1998.

DAOURA, L., Haaker, J., & Nylander, I. Early Environmental Factors Differentially Affect Voluntary Ethanol Consumption in Adolescent and Adult Male Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 35(3), 506–515, 2010.

DANIELS, PIETERSAN, CARSTENS, & STEIN. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. **Metab Brain Dis.** Jun;19(1-2):3-14, 2004.

DA SILVA, M. C. et al. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** (Print) , v. 5, p. 219-228, 2014

DA SILVA, A A M. et al. Low protein diet during gestation and lactation increases food reward seeking but does not modify sucrose taste reactivity in adult female rats. **INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE** , v. 49, p. 50-59, 2016.

DE SOUZA, J. 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.

DENG, X., ZHANG, S., WU, J., SUN, X., SHEN, Z., DONG, J., & HUANG, J. Promotion of Mitochondrial Biogenesis via Activation of AMPK-PGC1 α Signaling Pathway by Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extract, and Its Major Active Component 6-Gingerol. **Journal of Food Science**. 2020

DIAZ-CHÁVEZ A, Lajud N, Roque A, et al. Early life stress increases vulnerability to the sequelae of pediatric mild traumatic brain injury. **Exp Neurol**. 2020

ECHO, J.A., LAMONTE, N., ACKERMAN, T.F., Bodnar, R.J., 2002. Alterations in food intake elicited by GABA and opioid agonists and antagonists administered into the ventral tegmental area region of rats. **Physiol Behav** 76, 107-116.

EGECIOGLU E. et al. Hedonic and incentive signals for body weight control. **Rev Endocr Metab Disord**. 2011 Sep;12(3):141-51.

EVANS, K. R.; VACCARINO, F. J. Amphetamine- and morphine-induced feeding: Evidence for involvement of reward mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 1, p. 9–22, 1990.

FAGIOLINI, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L., Maffei, L. Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. **Vis. Res.** 34, 709–720, 1994.

FERENCZI S. et al. Changes in metabolic-related variables during chronic morphine treatment. **Neurochem Int** 2010;57:323–330.

FERRARI AJ, Charlson FJ, Norman RE, Patten SB, Freedman G, Murray CJL, et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. **PLoS Med**, 2013.

FROST JJ, Wagner HN, Jr, Dannals RF, Ravert HT, Links JM, Wilson AA, and others. Imaging opiate receptors in the human brain by positron tomography. **J Comput Assist Tomogr** 9(2):231–6, 1985.

FELITTI VJ, Anda RF, Nordenberg D, et al. Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. **Am J Prev Med**.14(4):245-258, 1998.

FRANKLIN, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. **Neuron**, 75(5), 747–761, 2012.

FORD, D., Deming, D. D., Tan, J. C., Phillips, R. M., Fry-Bowers, E. K., Barger, M. K., ... Boskovic, D. S. Oxidative Stress Biomarker Decreased in Preterm Neonates Treated With Kangaroo Mother Care. **Biological Research For Nursing**, 2020.

GLOVER, V. Maternal stress or anxiety in pregnancy and emotional development of the child. **Br. J. Psychiatry** 171, 105–106 (1997).

GEORGE, BORDNER, ELWAFI, & SIMEN. Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. **BMC Neurosci.** 2010 Sep 29;11:123.

GOODWILL, H.L. et al. Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. **Neuropsychopharmacology.** 44(4):711-720, 2019.

GIL-CAMPOS, M. et al. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. **Br J Nutr**, v. 96, n. 2, p. 201-26, Aug 2006.

GIULIANO, C., & Cottone, P. *The role of the opioid system in binge eating disorder.* **CNS Spectrums**, 20(06), 537–545, 2015.

GUSTAFSSON, L., PLOJ, K., & NYLANDER, I. Effects of maternal separation on voluntary ethanol intake and brain peptide systems in female Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 81(3), 506–516, 2005.

HEAL, D. J., Hallam, M., Prow, M., Gosden, J., Cheetham, S., Choi, Y. K., ... Hutson, P. Dopamine and μ -opioid receptor dysregulation in the brains of binge-eating female rats – possible relevance in the psychopathology and treatment of binge-eating disorder. **Journal of Psychopharmacology**, 31(6), 770–783, 2017

HALFORD, J. Cg. 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**, Vol. 61, pp. 159–168, 1998.

HIRVONEN J, Aalto S, Hagelberg N, Maksimow A, Ingman K, Oikonen V, and others. Measurement of central muopioid receptor binding in vivo with PET and [11C]carfentanil: a test-retest study in healthy subjects. **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 36(2):275–86, 2009.

HOUWING, D. J. et al. Maternal separation induces anhedonia in female heterozygous serotonin transporter knockout rats. **Behav Brain Res.** 2019.

H HERMAN J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2013.

H HURLEY, R. A. et al. The Brainstem: Anatomy, Assessment, and Clinical Syndromes. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**. Winter;22(1):iv, 1-7, 2010.

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.

KOMMERS DR, JOSHI R, VAN PUL C, et al. Features of Heart Rate Variability Capture Regulatory Changes During Kangaroo Care in Preterm Infants. **J Pediatr**, 92-98, 217.

KOSTEN TA, HUANG W, NIELSEN DA. Sex and litter effects on anxiety and DNA methylation levels of stress and neurotrophin genes in adolescent rats. **Dev Psychobiol**, 392-406, 2014.

KUHN, C. M., Butler, S. R., & Schanberg, S. M. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. **Science**, 201, 1034-1036, 1978.

KUHN, C. M., Pauk, J., & Schanberg, S. M. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. **Developmental Psychobiology**, 23, 395-410, 1990.

KUHN C.M. and SCHANBERGS. M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. **Int. J. Dev. Neurosci**. 16 (3-4), 261-270, 1998.

KRISTAL, M.B. The biopsychology of maternal behavior in nonhuman mammals. **ILAR Journal**, 50, 51–63, 2009.

KIKUSUI T, Faccidomo S, Miczek KA. Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. **Psychopharmacology** (Berl), 2005.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 427–431, 2009.

KOJIMA, S. et al. Maternal contact differentially modulates central and peripheral oxytocin in rat pups during a brief regime of mother-pup interaction that induces a filial huddling preference. **Journal of neuroendocrinology**, v. 24, n. 5, p. 831–40, 2012.

KOROTKOVA, T., & Ponomarenko, A. To eat? To sleep? To run? Coordination of innate behaviors by lateral hypothalamus, **Neuroforum**, 23(2), 45-55, 2017.

KURNIAWATI, Rustina, Y., & Budiati, T. Peer Support Increases Maternal Confidence, Kangaroo Mother Care Implementation and Weight Gain in LBW Infants. **Comprehensive Child and Adolescent Nursing**, 42(sup1), 252–260, 2019

LE MAGNEN, J. et al. Pain modulating and reward systems: A single brain mechanism? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 12, n. 5, p. 729–733, 1980.

LEWIS CR, Staudinger K, Scheck L, Olive MF. The effects of maternal separation on adult methamphetamine self-administration, extinction, reinstatement, and MeCP2 immunoreactivity in the nucleus accumbens. **Front Psychiatry**, 2013.

LUTTER, M.; NESTLER, E. J. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. **J Nutr**, v. 139, n. 3, p. 629-32, 2009.

LIU D. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic–pituitary–adrenal responses to stress. **Science** 277 1659–1662, 1997.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 8, p. 799-806, 2000.

LI, Y., Herbell, K., Bloom, T., Sharps, P., & Bullock, L. F. C. Adverse Childhood Experiences and Mental Health among Women Experiencing Intimate Partner Violence. **Issues in Mental Health Nursing**, 1–7, 2020.

LADD, C. O. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Prog Brain Res**, v. 122, p. 81-103, 2000.

LAMBERT, P. D., Wilding, J. P. H., Al-Dokhayel, A. A. M., Gilbey, S. G., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. Naloxone-induced anorexia increases neuropeptide Y concentrations in the dorsomedial hypothalamus: Evidence for neuropeptide Y-opioid interactions in the control of food intake. **Peptides**, 15(4), 657–660, 1994.

LEVINE, S. et al. Time Course of the Effect of Maternal-Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Infant Rat. **Developmental Psychobiology**, 547–558, 1991.

LEE JH, Kim JY, Jahng JW. Highly Palatable Food during Adolescence Improves Anxiety-Like Behaviors and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction in Rats that Experienced Neonatal Maternal Separation. *Endocrinol Metab (Seoul)*. ;29(2):169-178, 2014.

LOVETM, Stohler CS, Zubieta JK. Positron emission tomography measures of endogenous opioid neurotransmission and impulsiveness traits in humans. **Arch Gen Psychiatry** 66(10):1124–34, 2009.

LUTTER, M.; NESTLER, E. J. Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. **J. Nutr.** 139: 629–632, 2009.

MALLIK, A., Chanda, M. L., & Levitin, D. J. Anhedonia to music and mu-opioids: Evidence from the administration of naltrexone. **Scientific reports**, 7, 41952, 2017.

MICIONI Di BONAVENTURA MV, CICCOCIPPO R, ROMANO A, et al. Role of bed nucleus of the stria terminalis corticotrophin-releasing factor receptors in frustration stress-induced binge-like palatable food consumption in female rats with a history of food restriction. **J Neurosci**, 2014.

MIRAGAIA, A. S. et al. Maternal Deprivation Increases Anxiety- and Depressive-Like Behaviors in an Age-Dependent Fashion and Reduces Neuropeptide Y Expression in the Amygdala and Hippocampus of Male and Female Young Adult Rats. **Front Behav Neurosci**, 2018.

MELA, D. J. Eating for pleasure or just wanting to eat? Reconsidering sensory hedonic responses as a driver of obesity. **Appetite**, 2006.

MEYER, J. S. Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. **Physiological Review**. 65, 946-1021, 1985.

MIRANDA RA. et al. Early weaning leads to specific glucocorticoid signaling in fat depots of adult rats. **Endocrine** p.1-10, 2019.

MACDONALD, A.F., BILLINGTON BIL, C.J., LEVINE, A.S., 2004. Alterations in food intake by opioid and dopamine signaling pathways between the ventral tegmental area and the shell of the nucleus accumbens. **Brain Res** 1018, 78-85.

MARGOLIS, E.B., HJELMSTAD, G.O., FUJITA, W., FIELDS, H.L. Direct bidirectional mu-opioid control of midbrain dopamine neurons. **J Neurosci** 34, 14707-14716, 2014.

MOHTASHAMI BORZADARAN F, Joushi S, Taheri Zadeh Z, Sheibani V, Esmailpour K. Environmental enrichment and pain sensitivity; a study in maternally separated rats. **Int J Dev Neurosci**. 2020.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature Neuroscience**, 8(11), 1445–1449, 2005.

NASLUND, E.; HELLSTROM, P. M. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. **Physiol Behav**, v. 92, n. 1-2, p. 256-62, 2007.

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, 2008.

NO, M., HEO, J., YOO, S. et al. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. **Pflugers Arch - Eur J Physiol** 472, 179–193, 2020.

NUMMENMAA, L., Saanijoki, T., Tuominen, L., Hirvonen, J., Tuulari, J. J., Nuutila, P., & Kalliokoski, K. μ -opioid receptor system mediates reward processing in humans. **Nature Communications**, 9(1), 2018.

ODEON MM, Acosta GB. Repeated maternal separation: Alcohol consumption, anxious behavior and corticosterone were reversed by a non-pharmacological treatment. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 2019.

ORSO R. et al. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. **Stress**. Jan;21(1):19-27, 2018.

ORGILÉS M, Penosa P, Morales A, Fernández-Martínez I, Espada JP. Maternal Anxiety and Separation Anxiety in Children Aged Between 3 and 6 Years: The Mediating Role of Parenting Style. **J Dev Behav Pediatr**.;39(8):621-628, 2018.

PACAK K. et al. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol*, 1998.

PAPADAKAKIS A, Sidiropoulou K, Panagis G. Music exposure attenuates anxiety- and depression-like behaviors and increases hippocampal spine density in male rats. **Behav Brain Res**. 2019

PIHOKER, C. Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary- adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, n. 7, p. 485-93, 1993.

PLAUT, S. M.; DAVIS, J. M. Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels. **Physiology and Behavior**, v. 8, n. 1, p. 43–51, 1972.

PECKYS D, Landwehrmeyer GB. Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. **Neuroscience** 88(4): 1093–135, 1999.

PROSSIN AR, Love TM, Koeppe RA, Zubieta JK, Silk KR. Dysregulation of regional endogenous opioid function in borderline personality disorder. **Am J Psychiatry** 167(8):925–33, 2010.

QI, Y. et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. **Nat Med**, v. 10, n. 5, p. 524-9, 2004.

RIVAROLA, M. A. RENARD G. M. What We Know About the Long-Term Consequences Of Early Maternal Separation And Neuroendocrine Response To Stresses. **Rev. Farmacol. Chile** 7(1): 17-25, 2014.

ROMEO R. D. Stress and Brain Morphology. In: Encyclopedia of Behavioral Neuroscience. **Elsevier**, Oxford, United Kingdom, 2010.

RYU, V. et al. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. **Brain Res**, v. 1295, p. 127-34, ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993, 2009.

RUI. Brain regulation of energy balance and body weight. **Rev Endocr Metab Disord**.c;14(4):387-407, 2013.

ROCCHI, G., Sterlini, B., Tardito, S., Inglese, M., Corradi, A., Filaci, G., ... Martino, M. Opioidergic System and Functional Architecture of Intrinsic Brain Activity: Implications for Psychiatric Disorders. **The Neuroscientist**, 2020.

SILVA, M. C. et al. Perinatal stress: characteristics and effects on adult eating behavior. **Rev. Nutr.** vol.26 no.4 Campinas, 2013.

SICKMANNL HM, ARENRZEN TS, DYRBY TB, Plath N, KRISTENSEN MP. Prenatal stress produces sex-specific changes in depression-like behavior in rats: implications for increased vulnerability in females. **J Dev Orig Health Dis.** 2015.

SCHMIDT, M. V.; STERLEMANN, V.; MÜLLER, M. B. Chronic stress and individual vulnerability. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1148, p. 174-83, 2008.

STOTT, D. H. Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. **Dev. Med. Child. Neurol.** 15, 770–787, 1973

SONIA J. LUPIEN, BRUCE S. MCEWEN, MEGAN R. GUNNAR, CHRISTINE HEIM. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nat Rev Neurosci** 10, 434–445, 2009

SOUZAa JA, do Amaral Almeida LC, Tavares GA, et al. Dual exposure to stress in different stages of development affects eating behavior of male Wistar rats. **Physiol Behav.** 2020

SOUZAb JA, da Silva MC, Costa FCO, et al. 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**, 2020.

SANCHEZ, M. M. et al. Alterations in diurnal cortisol rhythm and acoustic startle response in nonhuman primates with adverse rearing. **Biol. Psychiatry** 57, 373–381, 2005.

SANCHEZ, M. M. The impact of early adverse care on HPA axis development: nonhuman primate models. **Horm. Behav.** 50, 623–631, 2006

SAVIC D, Knezevic G, Matic G, Damjanovic S, Spiric Z. Posttraumatic and depressive symptoms in beta-endorphin dynamics. **J Affect Disord** 181:61–6, 2015

STEPEN C. WOODS and DAVID A. D'ALESSIO. Central Control of Body Weight and Appetite. **J Clin Endocrinol Metab.** ;93(11 Suppl 1):S37-50. doi: 10.1210/jc.2008-1630.

SHAH NS, Donald AG, editors. Endorphins and opiate antagonists in psychiatric research: clinical implications. Boston, MA: **Springer**, 1982.

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

SULLIVAN, R. M.; HOLMAN, P. J. Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: The role of corticosterone. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 835–844, 2010.

SPENCER, S. J. Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. **Front Neurosci**, v. 7, p. 109, 2013.

SCHWARTZ, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, 404(6778), 661–671, 2000.

STROHER, R., de Oliveira, C., Stein, D. J., de Macedo, I. C., Goularte, J. F., da Silva, L. S., ... Torres, I. L. S. Maternal deprivation and sexalter central levels of neurotrophins and inflammatory cytokines in rats exposed to palatable food in adolescence. **Neuroscience**, 2020.

TANDON, S., Keefe, K. A., & Taha, S. A. Mu opioid receptor signaling in the nucleus accumbens shell increases responsiveness of satiety-modulated lateral hypothalamus neurons. **European Journal of Neuroscience**, 45(11), 1418–1430, 2017.

TEICHER MH. Childhood trauma and the enduring consequences of forcibly separating children from parents at the United States border. **BMC Med.**;16(1):146, 2018

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**. Anais, 2002.

TSCHOPM; HEIMAN ML. Rodent obesity models: an overview. **J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc**; 109(6):307–19, 2001.

THOMPSON, S. J., Pitcher, M. H., Stone, L. S., Tarum, F., Niu, G., Chen, X., Kiesewetter, D. O., Schweinhardt, P., & Bushnell, M. C. Chronic neuropathic pain reduces opioid receptor availability with associated anhedonia in rat. **Pain**, 159(9), 1856–1866, 2018.

THOMPSON, S. M., Simmons, A. N., & McMurray, M. S. The effects of multiple early life stressors on adolescent alcohol consumption. **Behavioural Brain Research**, 380, 112449, 2020.

TUOMINEN L, Salo J, Hirvonen J, Nagren K, Laine P, Melartin T, and others. 2012. Temperament trait harm avoidance associates with mu-opioid receptor availability in frontal cortex: a PET study using carfentanil. **Neuroimage**, 2012.

URIBE JM, Pinto DM, Vecino-Ortiz AI, Gómez-Restrepo C, Rondón MP. Absenteeism, and lost work productivity among depressive patients from five cities of Colombia. **Value Heal Reg Issues**; 14: 15–9, 2017.~

VAZQUEZ V, Penit-Soria J, Durand C, Besson MJ, Giros B, Dauge V. Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood. **J Neurosci**, 2005.

VAZQUEZ V, Giros B, Dauge V. Maternal deprivation specifically enhances vulnerability to opiate dependence. **Behav Pharmacol**, 2006.

VETULANI, J. Early maternal separation: A rodent model of depression and a prevailing human condition. **Pharmacological reports**, 2018.

WILLIAMS, J.T. et al. Direct excitatory action of opioids?, **Journal of Neuroscience**, 2015.

WALKER, C. D. et al. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 364–382, 2004.

WESTERGA J., Gramsbergen, A., 1990. The development of locomotion in the rat. *Brain Res. Dev.* **Brain Res.** 57, 163–174, 1990.

WOODS SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. **J Clin Endocrinol Metab.** 2008.

YANG R, Sun H, Wu Y, et al. Long-Lasting Sex-Specific Effects Based On Emotion- and Cognition-Related Behavioral Assessment of Adult Rats After Post-Traumatic Stress Disorder From Different Lengths of Maternal Separation. **Front Psychiatry**, 2019.

YAMAMOTO, M., Komori, T., Matsumoto, T., Zhang, K., Miyahara, S., Shizuya, K., & Okazaki, Y. Effects of single and repeated prolonged stress on mu-opioid receptor mRNA expression in rat gross hypothalamic and midbrain homogenates. **Brain Research**, 980(2), 191–196, 2003.

YAGI, T., Ueda, H., Amitani, H., Asakawa, A., Miyawaki, S., & Inui, A. The Role of Ghrelin, Salivary Secretions, and Dental Care in Eating Disorders. **Nutrients**, 4(8), 967–989, 2012.

ZHANG L.X. et al. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. **Dev Brain. Res.** 133, 1–11, 2002.

ZHANG M, Kelley AE: Intake of saccharin, salt, and ethanol solutions is increased by infusion of a mu opioid agonist into the nucleus accumbens. **Psychopharmacology (Berl)** 159:415–423, 2002.

ZHANG M, Balmadrid C, Kelley AE. Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. **Behav Neurosci**; 117(2): 202–211, 2003.

ZHANG, W. DAMGO depresses inhibitory synaptic transmission via different downstream pathways of mu opioid receptors in ventral tegmental area and periaqueductal gray. **Neuroscience** 301, 144-154, 2015.

ZIMMERBERG, B.; SAGESER, K. A. Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior. **Front Psychiatry**, v. 2, p. 39. ISSN 1664-0640 (Electronic) 1664-0640, 2011.

ZUBIETA JK, Dannals RF, Frost JJ. Gender and age influences on human brain mu-opioid receptor binding measured by PET. **Am J Psychiatry**, 1998.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8840 | 2126 8351
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº 57/18

Recife, 09 de julho de 2018.

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profa. Sandre Lopes de Souza**
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0009/2018

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos do estresse por separação materna sobre a motivação alimentar e ativação neuronal na Área Tegmentar Ventral e Núcleo Accumbens.**", Registrada com o nº 0009/2018 sob a responsabilidade de **Profa. Sandre 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 | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 10/05/2018 a 10/12/2020 |
| Espécie/linhagem/raça | Rato heterogenico |
| Nº de animais | 64 |
| Peso/Idade | 275g/ 0 a 200 dias |
| Sexo | Femeas (32) e (32) Macho |
| Origem | Biotério da Nutrição |

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345681