

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Larisse Machado Couto

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E ESTRESSE ALIMENTAR AGUDO
SOBRE O SISTEMA OPIOIDÉRGICO E TAMANHO DA REFEIÇÃO COM DIETA
PALATÁVEL EM RATOS WISTAR JOVENS**

RECIFE

2022

LARISSE MACHADO COUTO

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E ESTRESSE ALIMENTAR AGUDO
SOBRE O SISTEMA OPIOIDÉRGICO E TAMANHO DA REFEIÇÃO COM DIETA
PALATÁVEL EM RATOS WISTAR JOVENS**

Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Nutrição da
Universidade Federal de Pernambuco
como requisito para obtenção de grau
de Nutricionista.

Área de concentração: Bases
Experimentais.

Orientador(a): Elizabeth do Nascimento
Coorientador(a): Julliet Araújo de Souza

RECIFE

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Couto, Larisse Machado.

Efeitos da separação materna e estresse alimentar agudo sobre o sistema opioide e tamanho da refeição com dieta palatável em ratos wistar jovens.

/ Larisse Machado Couto. - Recife, 2022.

43 : il., tab.

Orientador(a): Elizabeth do Nascimento

Coorientador(a): Juliet Araújo de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Nutrição - Bacharelado, 2022.

1. Separação materna. 2. Comportamento alimentar. 3. Sistema opioide.
I. Nascimento, Elizabeth do. (Orientação). II. Souza, Juliet Araújo de.
(Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

LARISSE MACHADO COUTO

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E ESTRESSE ALIMENTAR AGUDO
SOBRE O SISTEMA OPIOIDÉRGICO E TAMANHO DA REFEIÇÃO COM DIETA
PALATÁVEL EM RATOS WISTAR JOVENS**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção de grau de Nutricionista.

Área de concentração: Bases Experimentais.

Aprovado em: 27/10/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Julliet Araújo de Souza (Co-orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Matilde Cesiana da Silva (Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Tássia Karin Ferreira Borba (Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, primeiramente, pela honra de me formar na universidade e curso que sempre quis. À minha mãe por todo colo e suporte e por nunca ter descreditado de mim. E aos meus avós, com quem gostaria de compartilhar essa conquista, mas que sei com certeza que teriam orgulho de ter mais uma neta graduada, mesmo não conhecendo esse universo.

AGRADECIMENTOS

Assim como dedico esse trabalho, também agradeço a Deus por me sustentar até aqui. Só Ele sabe das dificuldades, como foi árduo passar por tanta coisa até aqui mas foi Ele que me deu forças até mesmo quando não merecia.

Agradeço imensamente à minha família. Ao meu pai por toda luta para me manter em boas instituições e realizar cursos pré-vestibulares. Sua reação quando informei que fui aprovada na UFPE é inesquecível. À minha irmã pelo suporte, quando precisei de privacidade e de computador emprestado. Especialmente, agradeço à minha mãe, base da nossa família, sustento e fortaleza. Agradeço por todos os pedidos feitos a Deus por mim. Cheguei até aqui por mérito dela também.

Durante minha vida sempre tive bons amigos por onde passei, mas Deus foi reservando pessoas especiais para a graduação. Sou grata por todo carinho, incentivo e auxílio. Pude ter contato com muitas pessoas na graduação, até de outros cursos, mas deixo meu agradecimento em especial aos grupos G5, FTO, Zoológico e a quem foi minha dupla no final da graduação, Thais Falcão. Todos foram essenciais na minha jornada. Agradeço de coração a Felipe, por através de sua experiência me ensinar tanto na iniciação científica, pela sua disponibilidade em compartilhar e fazer possível a realização deste trabalho. Todos esses me suportaram em todos os sentidos e momentos. Aos demais amigos da vida, meu muito obrigada por tudo. São como acalento na vida, um tesouro.

Aqui, agradeço também ao meu namorado, por toda compreensão, paciência, ombro amigo, conselhos e encorajamento. Ele chegou em um período crítico, o ensino remoto, e sempre me apoiou. Com a escrita e desenvolvimento desse trabalho não foi diferente. Enxugou minhas lágrimas e me acalmou em meio à ansiedade. Sou grata por estar com alguém tão amigo e companheiro.

Quero agradecer à grande professora Elizabeth por aceitar a orientação, mas desde antes se fez presente durante a graduação. Obrigada pelas aulas e por nos guiar no caminho da nutrição, por ser exemplo de competência. Obrigada à minha querida co-orientadora, por em muitos momentos segurar na minha mão e não me deixar desistir. Que continue com esse brilho no olhar, empolgação e maestria no

ensinar. Mas obrigada também a todos os professores do departamento de nutrição pelo comprometimento com minha formação, ótimo trabalho e pelas oportunidades.

Agradeço à própria UFPE pela vivência. Desde as refeições no R.U., tardes de estudo nas bibliotecas, aulas práticas. Foi muito gratificante poder aproveitar mais dessa universidade, para além das salas de aula através de monitorias, projetos de extensão e iniciação científica. Através da graduação pude atender a população, prestar cursos e fazer ciência. É uma honra estudar na UFPE, todo meu amor a essa instituição que foi como uma segunda casa por muito tempo. Que resista em meio a todos os ataques. E, por fim, agradeço à instituição de fomento à pesquisa, CNPq, por viabilizar a realização desta pesquisa.

RESUMO

Estudos demonstram que experiências estressoras no início da vida têm potencial de modificar o pleno desenvolvimento do organismo. A ocorrência de eventos estressores nesse período, como a separação materna (SM), é capaz de modificar a reatividade do organismo ao estresse e alterar o comportamento alimentar. O sistema opioide faz parte da regulação desse comportamento, aumentando a motivação por alimentos palatáveis após ativação do receptor MOR. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da SM sobre o tamanho da refeição com uma dieta palatável, com ou sem estresse alimentar agudo e sobre a expressão gênica do receptor opioide MOR no hipotálamo. Foram utilizados ratos wistar machos jovens que foram submetidos à SM durante o ciclo escuro todos os dias durante as primeiras duas semanas de vida por 180 minutos. Aqueles que não sofreram a SM, constituíram o grupo controle. Aos 35 dias de vida, o tamanho da refeição com uma dieta palatável foi avaliado. Essa é uma medida que diz respeito à quantidade de calorias ingeridas por Kg de peso corporal do animal. Com 36 dias de vida, foram submetidos ao estresse alimentar agudo. Esse tipo de estresse, de forma aguda, refere-se à exposição a um agente estressor por um período limitado, diferente do estresse crônico, que ocorre por um tempo mais prolongado. O estresse alimentar consistiu numa exposição a um cookie envolvido em material metálico, impedindo a ingestão do alimento, e posteriormente seguiu-se a eutanásia. Os hipotálamos foram dissecados para análise molecular do receptor MOR. Os resultados demonstraram que o grupo separado não apresentou alteração no tamanho da refeição com dieta palatável. Porém observou-se aumento do tamanho da refeição no grupo controle com estresse alimentar, resultado ausente nos outros grupos. Quanto à expressão do receptor MOR no hipotálamo, foi observado aumento no grupo separado com estresse alimentar, sem verificar esse resultado nos demais grupos experimentais. Portanto, conclui-se que a SM não apresentou efeito sobre o comportamento alimentar. Porém, a exposição a um segundo agente estressor, mesmo não tendo efeito sobre o comportamento, tem efeito sobre seus reguladores moleculares, como o receptor MOR no hipotálamo.

Palavras-chave: Separação materna; Comportamento alimentar; Sistema opioide.

ABSTRACT

Studies show that stressful experiences in the early period of life have the potential of modifying the full development of the organism. The occurrence of stressful events during this period, such as the maternal separation (MS), is capable of modifying the organism's reactivity to stress and changing the eating behavior. The opioidergic system is a part of this eating behavior regulation, increasing the motivation for palatable foods after the MOR receptor activation. Thus, the present study sought to evaluate the effects of the MS on meal size with a palatable diet, with or without acute eating stress and, also, about the MOR opioid receptor gene expression in the hypothalamus. Young male Wistar rats were subjected to maternal separation during the dark cycle every day for the first two weeks of life for 180 minutes. Those that did not suffer from MS, constituted the control group. At 35 days of age, the meal size with a palatable diet was evaluated. This is a measure regarding the amount of calories ingested per Kg of body weight of the animal. At 36 days of age, they were subjected to acute eating stress. This type of stress, acutely, refers to the exposure to a stressor agent through a limited period, different from the chronic stress that occurs for a longer period of time. The food stress consisted of an exposure of a cookie wrapped in a metallic material, preventing food ingestion, and subsequently the euthanization followed. The hypothalamuses were dissected for receptor MOR molecular analysis. The results show that the separated groups did not present alteration in the palpable diet meal size. Although, it was noticed an increase of the size of the meal of the control group with food stress, this result absent in the other groups. Regarding the receptor MOR expression in the hypothalamus, the increase was noticed only on the separated group with food stress, without verifying this result on the other experimental groups. Hence, it is concluded that the MS did not present an effect on eating behavior. Although, the exposure to a second stressor agent, even if not having the effect over the behavior, has effect over its molecules regulators, as the MOR receptor in the hypothalamus.

Key-words: Maternal separation; Eating behavior; Opioidergic system.

LISTA DE ABREVIACÕES

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
AVP - Arginina Vasopressina
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina
DPM - Desvio Padrão da Média
GREs - Elementos de Resposta aos Glicocorticóides
HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
mPFC - Córtex Pré-frontal Medial
NAcc - Núcleo Accumbens
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PHRE - Período Hiporresponsivo ao Estresse
PVN - Núcleo Paraventricular
SM - Separação Materna
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNC - Sistema Nervoso Central
UFPE- Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD)	15
2.2 Estresse	15
2.3 Estresse Neonatal e Separação Materna	17
2.4 Comportamento alimentar	19
2.4.1 Comportamento alimentar homeostático	20
2.4.2 Comportamento alimentar hedônico	21
2.4.2.1 Comportamento alimentar hedônico e sistema opioide	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Animais	25
4.2 Definição dos grupos experimentais e Separação materna	25
4.3 Tamanho da refeição com e sem estresse	26
4.4 Estresse alimentar agudo e eutanásia	26
4.5 Análise da expressão gênica do receptor opioide μ no hipotálamo	27
4.5.1 Eutanásia e obtenção do hipotálamo	27
4.5.2 Análise da expressão gênica	27
4.6 Análise estatística	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Tamanho da refeição	29
5.2 Expressão gênica do MOR no hipotálamo	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Para um correto desenvolvimento do organismo em sua totalidade, especificamente do sistema nervoso, o período de lactação apresenta grande importância. Em pesquisas que utilizam ratos como modelo animal, esse período corresponde às três primeiras semanas de vida, sendo as duas primeiras denominadas de Período Hiporresponsivo ao Estresse (PHRE) (DA SILVA et al., 2014), no qual agentes estressores que interferem na interação mãe-filhote, como a separação materna (SM), podem elevar os níveis de corticosterona e ativar o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), responsável pela regulação da resposta ao estresse (PIHOKER et al., 1993).

Alterações comportamentais na vida adulta, como depressão e ansiedade, têm sido objeto de estudos que abordam a exposição ao estresse no início da vida como seu agente causador. Evidências têm mostrado uma relação entre a perda de parentes próximos como pai e mãe no período inicial da vida de uma criança e a elevação do risco de desenvolver obesidade na vida adulta (D'ARGENIO et al., 2009; KOCH; SEPA; LUDVIGSSON, 2008). A SM, como um modelo de estresse precoce em animais, é capaz de gerar alterações permanentes no desenvolvimento do sistema nervoso, refletindo em consequências no comportamento alimentar (DE SOUZA et al., 2018). Nesse sentido, ratos separados durante a lactação apresentaram maior ingestão de uma dieta palatável, independente da fase de luminosidade no qual o estresse precoce ocorreu e do sexo do animal (DA SILVA et al., 2014; DE SOUZA et al., 2018). Observou-se também saciedade antecipada (DA SILVA et al., 2014) e hiperfagia de rebote (RYU et al., 2009). Os resultados já apresentados sugerem a ideia de que experiências estressoras no início da vida possuem importante influência em mudanças estabelecidas no comportamento, como o comportamento alimentar, na vida adulta.

Essas consequências, advindas da SM, parecem ser potencializadas a partir de uma segunda experiência estressora em um período posterior da vida (HILL et al., 2014). O estresse pode ser classificado quanto à sua duração em agudo e crônico. O estresse agudo encerra após o fim da ação do agente estressor e ocorre por tempo limitado. Já o estresse crônico, se baseia numa exposição mais prolongada no qual após a ausência do estressor, as respostas de adaptação são

mantidas por longo período (MARTINS CORTEZ; SILVA, 2007; PACÁK; PALKOVITS, 2001). Souza e colaboradores, em 2020, observou que os animais submetidos ao estresse da SM exibiram maior consumo de alimentos ricos em carboidrato após uma segunda experiência estressora, o estresse alimentar agudo. Os animais do grupo controle, por sua vez, apresentaram maior ingestão desses alimentos após exposição a um estresse alimentar crônico (DE SOUZA et al., 2020).

Entre as alterações apresentadas no desenvolvimento do sistema nervoso que envolvem os sistemas de neurotransmissores, merecem destaque aquelas relacionadas ao sistema opioide. Esse sistema apresenta três principais receptores, que são: μ (MOR), δ (DOR) e κ (KOR), e faz parte da via responsável pela recompensa (ROCCHI et al., 2020). Entre os receptores citados, o MOR é o único responsável por elevar a motivação por alimentos palatáveis, regulando, então, o comportamento alimentar hedônico, que é caracterizado pela motivação devido à sensação de prazer, não por necessidade calórica do organismo (GIULIANO; COTTONE, 2015).

A associação entre a SM e a elevação nos níveis de opióides no hipotálamo já foi verificada, sendo essa uma região central no processo de regulação do comportamento alimentar (GUSTAFSSON; PLOJ; NYLANDER, 2005). Isso indica a possibilidade das alterações que atingem o sistema opioide em resposta ao estresse precoce, como a SM, estarem subjacentes às que se manifestam no comportamento alimentar. Sendo assim, a hipótese do presente trabalho é que será observado aumento no tamanho da refeição com uma dieta palatável no grupo de animais separados e aumento na expressão gênica do receptor opioide MOR no hipotálamo.

A aplicação de práticas, como a iniciativa “mãe-canguru” em alguns estabelecimentos de saúde, tem ajudado a demonstrar a importância do contato materno para o melhor desenvolvimento de recém-nascidos (CONDE-AGUDELO; JM; DIAZ-ROSSELLO, 2011). Em recém-nascidos prematuros ou que apresentam baixo peso ao nascer há a redução de morbidade e mortalidade e o aumento na taxa de amamentação quando esse método é utilizado (CALDJI; DIORIO; MEANEY, 2000), além do aumento no ganho de peso, comprimento e no perímetro cefálico (CONDE-AGUDELO; JM, DIAZ-ROSSELLO, 2011). Portanto, a compreensão dos efeitos no comportamento alimentar e expressão gênica do receptor opioide

MOR no hipotálamo, causados pela SM, merece ser objeto de estudo, pois trará informações importantes para afirmações de práticas na área de saúde que protejam o período inicial da vida de agressões ambientais, bem como promovam o crescimento e desenvolvimento saudáveis do sistema nervoso e do organismo como um todo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD)

Atualmente, muitos trabalhos buscam estudar a influência do ambiente no início da vida agindo sobre a expressão de genes e provocando efeitos na saúde em longo prazo. Porém, considera-se que os estudos acerca desse tema tiveram início em 1986, com a publicação inovadora do epidemiologista Barker (BARKER, 1986).

Nesse documento, ele trouxe observações epidemiológicas relacionando a má nutrição neonatal e o aumento da vulnerabilidade a doenças cardíacas na fase adulta, levantando ao que posteriormente se desenvolveria na teoria da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD). A partir desse paradigma, inúmeros estudos se disseminaram nas mais diversas áreas da ciência, como a embriologia, nutrição, endocrinologia, cardiologia e psicologia (WADHWA et al., 2009).

A forma pela qual as experiências ambientais interagem com o genótipo para produzir fenótipos diferentes não está bem esclarecida, contudo dois processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento celular são bem conhecidos: a diferenciação, em que as células se desenvolvem em um tecido específico ou dão origem a um órgão específico; e a variação, que representa pequenas diferenciações entre células de um mesmo tecido ou órgão (SUZUKI, 2018).

Sabe-se que os mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação e variação são de natureza epigenética. No entanto, aqueles envolvidos com o desenvolvimento de doenças na vida adulta através da interação de fatores ambientais com conjuntos de genes ainda são obscuros (SUZUKI, 2018). Sabe-se, contudo, que um dos fatores ambientais que pode ter consequências sobre a morbimortalidade posteriormente é o estresse.

2.2 Estresse

Todos os organismos trabalham para manter um estado de equilíbrio interno, denominado homeostase. Esse equilíbrio é ameaçado com frequência por condições

adversas do ambiente, as quais podem ser denominadas conjuntamente de agentes estressores ou, simplesmente, estressores. Estes tem a capacidade de deflagrar a resposta fisiológica ao estresse. Sendo assim, o estresse é um estado de desequilíbrio, causado por agentes internos ou externos, os quais são enfrentados por um repertório de respostas comportamentais e fisiológicas que visam restabelecer o equilíbrio inicial (CHROUSOS, 2009).

Essas respostas visam adaptar o organismo à situação estressora e aumentar as chances de sobrevivência. As respostas comportamentais incluem aumento da excitação, estado de alerta, vigilância, cognição, atenção focada e analgesia, enquanto há inibição concomitante de funções vegetativas, como alimentação e reprodução. As respostas fisiológicas incluem aumentos no tônus cardiovascular, frequência respiratória e metabolismo intermediário (gliconeogênese e lipólise) (TSIGOS et al., 2000).

Essas respostas são desencadeadas pelo sistema do estresse, o qual está tanto no Sistema Nervoso Central (SNC) quanto na periferia. Os componentes centrais do sistema estão localizados no Hipotálamo e no Tronco Encefálico. No Hipotálamo, participam diretamente da resposta ao estresse os neurônios parvocelulares do Núcleo Paraventricular (PVN), produtores do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) e do hormônio Arginina Vasopressina (AVP), bem como a glândula pituitária, a qual produz o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH). No Tronco Encefálico, participam os neurônios CRH dos núcleos Paragigantocelular e Parabraquial, o *Locus coeruleus*, bem como outros grupos celulares produtores de norepinefrina (constituem o Sistema Nervoso Autônomo, SNA). Os componentes periféricos do sistema do estresse compreendem a glândula adrenal, a qual sintetiza os glicocorticoides, como o cortisol em humanos e a corticosterona em ratos; e as eferências do SNA (TSIGOS et al., 2000).

O Hipotálamo, juntamente com a pituitária e a glândula adrenal forma o eixo HPA. Um agente estressor é capaz de estimular a liberação de CRH pelo Hipotálamo no sistema porta-hipofisário, o qual age como o principal secretagogo do ACTH pela pituitária. Via corrente sanguínea, o ACTH tem como principal alvo o córtex da glândula adrenal, o qual libera os glicocorticoides. Estes são os efetores finais do eixo HPA. Os glicocorticoides agem em todas as células através dos seus receptores GR α e GR β (MUNCKT; GUYRE; HOLBROOKE, 1984). Esses receptores,

quando não ativados, encontram-se no citosol, formando heterodímeros com proteínas de choque térmico e imunofilinas (SMITH; TOFT, 1993). Após a ligação com os glicocorticoides, os receptores se desassociam do heterodímero e formam homodímeros entre si, os quais vão ao núcleo agir sobre os Elementos de Resposta aos Glicocorticoides (GREs) no DNA, estimulando ou reprimindo a expressão de genes responsivos. Essa resposta efetuada pelo eixo HPA tem duração mais longa quando comparada à resposta efetuada pelo SNA.

O SNA regula os vários sistemas do organismo através dos seus componentes simpático e parassimpático. Em geral, as atividades de ambos os componentes se antagonizam. Assim, enquanto o simpático aumenta a frequência cardíaca, o parassimpático diminui, por exemplo. Como regra geral, pode-se afirmar que os sistemas que estão ativos durante o exercício físico são ativados pelo simpático e inibidos pelo parassimpático e vice-versa. A inervação simpática origina-se de fibras pré-ganglionares eferentes, cujos corpos celulares estão localizados na coluna intermediolateral da medula espinal. Estas fazem sinapse em neurônios pós-ganglionares na cadeia bilateral de gânglios simpáticos localizados próximo à coluna vertebral. Eles inervam as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, os músculos esqueléticos, o coração, os rins, o intestino, o tecido adiposo e muitos outros órgãos (BURNSTOCK; MILLER, 1989). A ativação simpática capacita o indivíduo a lutar ou fugir do agente estressor. Para isso, há aumento dos níveis circulantes de adrenalina e de noradrenalina, da frequência cardíaca, da vasoconstrição periférica e da mobilização de substratos energéticos. O componente parassimpático, geralmente, apresenta ações opostas ao componente simpático (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

2.3 Estresse Neonatal e Separação Materna

Durante o período neonatal, que em ratos corresponde aos primeiros 14 dias de vida, a resposta ao estresse é mínima. Por isso, recebe o nome de Período Hiporresponsivo ao Estresse (PHRE). Os receptores de glicocorticóides estão funcionais desde o 13º dia embrionário, e o *feedback* negativo do eixo HPA pela corticosterona se estabelece entre o 13º e o 17º dia. Portanto, via *feedback* negativo, os glicorreceptores podem atuar no nível suprapituitário para inibir a síntese e/ou

secreção de CRH e AVP. Como consequência dessa baixa síntese e/ou secreção, a glândula adrenal de ratos em desenvolvimento ainda é imatura (HABIB; GOLD; CHROUSOS, 2001). Nessa fase, os níveis plasmáticos de glicocorticoides são baixos, contudo, eles circulam no plasma em estado livre (não ligado à proteína transportadora transcortina), ou seja, em estado biologicamente ativo (TRITOS et al., 1999). Portanto, apesar da baixa concentração plasmática total de glicocorticóides durante o PHRE, a concentração de sua forma ativa é alta, o que é suficiente para suas ações biológicas. Essas ações biológicas, compreendem a maturação cerebral, pois os glicocorticoides iniciam a maturação dos terminais nervosos, remodelam axônios e dendritos e afetam a sobrevivência celular. Por isso, níveis controlados de glicocorticoides são importantes para o desenvolvimento do animal. Por outro lado, níveis elevados prejudicam o desenvolvimento e a função do sistema nervoso (PHILLIPS, 2006). A administração de glicocorticóides em ratas gestantes, retarda a maturação neuronal e a mielinização, alterando a formação de sinapses, a estrutura neuronal, e a neurogênese (MEIJER; DE KLOET, 1998).

Embora hiporresponsivos, esses indivíduos apresentam uma resposta aguda ao estresse quando são separados de suas mães, mesmo quando não são expostos a nenhum outro estressor (MEIJER et al., 1998). Por essa razão, a separação materna tem se estabelecido como um modelo de estresse precoce. Ela consiste em separar, diariamente, mães e filhotes por um período que varia de 1 a 24h. Uma das práticas mais comuns é separá-los por 3h. Também há separações de apenas 15 minutos. Porém, estas não apresentam os efeitos deletérios da separação por longos períodos, que envolvem horas ou até um dia inteiro. De fato, a separação por curtos períodos parece ser benéfica para os animais, pois mimetiza o que realmente ocorre na natureza, em que as mães deixam os ninhinhos por curtos períodos de tempo para buscar alimentos e avaliar o ambiente (MANIAM; MORRIS, 2010b; MCINTOSH; ANISMAN; MERALI, 1999).

Os efeitos deletérios da separação materna podem ser vistos no comportamento emocional. Ratos adultos, que foram separados de suas mães durante o período de lactação, são mais ansiosos quando avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado. Também apresentam-se mais depressivos quando avaliados no teste de nado forçado (PAPADAKAKIS; SIDIROPOULOU; PANAGIS, 2019). Esse comportamento depressivo já pode ser observado durante a

adolescência. Além de prejudicar o comportamento emocional, a separação materna aumenta a sensibilidade dolorosa, provoca maior agitação em situações de luta, bem como predispõe ao consumo de drogas (CUI et al., 2020; BORZADARAN et al., 2020; ODEON; ACOSTA, 2019). Além disso, a separação materna afeta o comportamento alimentar. Em animais separados tem sido descrito um aumento do consumo de dieta palatável (MANIAM; MORRIS, 2010a), maior preferência por soluções açucaradas (MICHAELS; HOLTZMAN, 2007), hiperfagia de rebote (RYU et al., 2009) e saciedade antecipada (DA SILVA et al., 2014).

2.4 Comportamento alimentar

O comportamento alimentar está relacionado com a regulação da ingestão de alimentos e do gasto de energia, sendo mediados sobretudo pelo sistema nervoso central (SNC) através de vários circuitos neurais (RUI, 2013). Esse controle depende do recebimento e integração, feitos pelo cérebro, de diversos sinais indicativos do nível de energia do organismo e do estado nutricional do indivíduo para gerar respostas acerca da ingestão de alimentos, atividade metabólica e gasto energético (WILLIAMS et al., 2001).

A composição da alimentação e a quantidade de alimentos ingeridos variam, em sua maioria, entre as refeições consumidas num mesmo dia e aquelas consumidas num período de vários dias, os quais abrangem muitas refeições. Dentre os fatores que influenciam a quantidade calórica ingerida, tem-se fatores sociais, emocionais, econômicos, entre outros, considerados não biológicos e, por isso, a quantidade varia entre os indivíduos diariamente. De forma biológica, há uma regulação entre a ingestão de energia e o gasto energético quando se observa um longo período com muitas refeições. Tal fenômeno busca alcançar a homeostase energética, que é um processo regulatório que promove equilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia (SCHWARTZ et al., 2000).

Nos últimos anos, foram descobertas no hipotálamo algumas moléculas de sinalização que atuam na ingestão alimentar e são importantes para manter o equilíbrio energético (TIMPER; BRÜNING, 2017). A compreensão dos circuitos neurais em que essas moléculas estão envolvidas e também da regulação hormonal a que estão submetidas, coopera para um melhor entendimento da homeostase

energética, considerado um processo altamente complexo (TIMPER; BRÜNING, 2017).

2.4.1 Comportamento alimentar homeostático

Durante o ato de se alimentar, sinais de saciação são desencadeados, como a secreção de peptídeos no trato gastrointestinal, que enviam mensagens ao cérebro. Esses sinais buscam inibir a ingestão de alimentos e, portanto, cessar a alimentação. Esses são os sinais que atuam para finalizar uma refeição. Porém, também há algumas substâncias que são consideradas sinais de adiposidade. Essas agem num período de dias, que abrange muitas refeições. Dentre eles, há o hormônio produzido pelo pâncreas, a insulina, e a leptina, hormônio secretado pelas células adiposas. Tais hormônios se encontram na circulação proporcionalmente ao teor corporal de gordura e sinalizam no sistema nervoso central, no qual se ligam a receptores expressos por neurônios que regulam a ingestão energética (SCHWARTZ et al., 2000).

O hipotálamo é a região considerada como o centro de controle da ingestão de alimentos e do peso corporal. Nele há a região do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), tido como o 'centro de saciedade', e a área hipotalâmica lateral (LHA) vista como 'centro da fome'. Uma outra importante área na regulação do comportamento alimentar é o Núcleo Arqueado (ARC) (SCHWARTZ et al., 2000).

O ARC se constitui de circuitos neurais distintos que apresentam importante função na homeostase energética, nos quais podemos citar as populações neuronais que sintetizam os seguintes neuropeptídeos hipotalâmicos: o Neuropeptídeo Y (NPY), a Proteína relacionada ao Agouti (AgRP), a Pró-opiomelanocortina (POMC) e o Transcrito Relacionada à Cocaína e Anfetamina (CART) (TIMPER; BRÜNING, 2017).

O NPY e o AgRP estimulam a ingestão alimentar (balanço energético positivo), sendo sinalizadores anabólicos. POMC e CART, por sua vez, são inibidos por concentrações baixas de leptina e atuam inibindo o consumo de alimentos. O NPY tem efeito de curta duração, já o AgRP apresenta uma duração maior. Porém, os mecanismos envolvidos nessa diferença, ainda não estão bem relatados (TIMPER; BRÜNING, 2017).

As populações neuronais orexígenas e anorexígenas do ARC emitem projeções para outras áreas do SNC, como o PVN, a Zona incerta, a Área Perifornical (PFA) e o LHA. A liberação de NPY no PVN, na PFA e no LHA estimula a ingestão alimentar, enquanto que a liberação do Hormônio alfa-estimulante de melanócitos (α -MSH) (um derivado da POMC), no PVN, tem um efeito inibitório sobre a ingestão (SCHWARTZ et al., 2000).

Pode-se observar que esse controle integrado entre hormônios periféricos e neuropeptídeos centrais é guiado pelo fornecimento de energia através dos nutrientes obtidos nas refeições ou da energia estocada como gordura no tecido adiposo (SCHWARTZ et al., 2000). Contudo, o nível energético não é o único sinal para a regulação da ingestão alimentar, o prazer também pode ser um potente regulador desse comportamento (BERTHOUD, 2011). Nesse caso, fala-se em comportamento alimentar hedônico, ou seja, aquele que é dirigido pelo prazer mais do que pela necessidade energética.

2.4.2 Comportamento alimentar hedônico

A ingestão alimentar regulada por fatores cognitivos, de recompensa e emocionais é comumente denominada de hedônica. Essa palavra vem do grego *hedonê*, que significa prazer, vontade (BERTHOUD, 2011).

Na regulação do componente hedônico do comportamento alimentar destacam-se áreas cortico-límbicas. Estudo em humanos demonstrou que a visão de fotos de alimentos de alto teor calórico, quando comparada aos alimentos de baixo teor calórico, aumentou a atividade neural em áreas relacionadas à recompensa, como o córtex orbitofrontal, estriado ventral, amígdala e ínsula anterior. Esses achados foram relacionados com o gostar subjetivo dos alimentos representados pelas imagens (GOLDSTONE et al., 2009). Esse gostar é um dos pilares do comportamento alimentar hedônico. Além dele, tem-se o querer e o aprender. O querer diz respeito ao desejo apetitivo, ou seja, a motivação, o incentivo saliente. O aprender, por sua vez, relaciona-se à memória e aos processos cognitivos que podem afetar a alimentação com base em experiências anteriores (MORALES; BERRIDGE, 2020).

Em linhas gerais, pode-se afirmar que a regulação desses processos envolve sistemas de neurotransmissores e regiões encefálicas específicas. O querer está associado, principalmente, ao sistema dopaminérgico; o aprender está mais associado a uma área do que a um neurotransmissor, sendo essa área o hipocampo. O gostar, por sua vez, recebe forte influência do sistema opioidérgico na sua regulação (SASAKI, 2017); e é sobre a relação desse sistema com o comportamento alimentar que discorrerá o tópico a seguir.

2.4.2.1 Comportamento alimentar hedônico e sistema opioidérgico

Os opióides endógenos abrangem as endorfinas, encefalinas e dinorfinas. Esses peptídeos são reconhecidos por seus receptores, os quais são o MOR, o DOR e o KOR. Esses também são identificados por letras gregas, sendo o receptor μ para o MOR, o δ - para o DOR e o κ - para o KOR. Esses receptores agem por meio de mecanismos envolvendo a proteína G, ou seja, são metabotrópicos. A endorfina é expressa em células do núcleo arqueado do hipotálamo e do tronco cerebral. Atua via MOR e influencia o apetite. A encefalina atua através do MOR e do DOR, os quais estão distribuídos por todo o encéfalo. A dinorfina atua via KOR, e é encontrada na medula espinal e em muitas partes do cérebro, incluindo o hipotálamo (BODNAR, 2009).

O sistema opioidérgico desempenha suas funções nos processos neurais de recompensa, os quais podem desencadear a instauração e o desenvolvimento de comportamentos viciantes. Alguns desses comportamentos incluem a auto administração de drogas, como os próprios agonistas opioidérgicos e outras drogas de abuso, como a nicotina e o álcool. As vias neurais envolvidas na regulação dos comportamentos viciantes, frequentemente, também estão envolvidas nos processos regulatórios da recompensa alimentar. Essas vias utilizam vários neurotransmissores, dentre eles os opióides. Sendo assim, estudos com administração de agonistas ou antagonistas opioidérgicos fornecem informações importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na recompensa alimentar (FERENCZI et al., 2010).

Os antagonistas opioidérgicos diminuem tanto o comportamento de vício direcionado a drogas quanto a alimentos palatáveis. Além disso, antagonistas como

a naloxona e a naltrexona, diminuem a ingestão de alimentos palatáveis. Por outro lado, os agonistas opioidérgicos, como a morfina e os análogos sintéticos das encefalinas, têm o efeito oposto, aumentando a ingestão alimentar (FERENCZI et al., 2010).

Outro fator importante quanto à administração de drogas opioidérgicas é a cronicidade. A administração aguda de morfina e outros agonistas aumentam a ingestão alimentar e promovem o ganho de peso. Esses resultados são revertidos pelo uso de naloxona. Em contrapartida, a administração crônica de morfina levou a um padrão desregulado de alimentação. A administração de agonistas opioidérgicos no Núcleo Accumbens (NAcc), aumentou o consumo de uma dieta rica em gordura em comparação com uma dieta de baixo teor de gordura ou uma dieta rica em carboidratos. Em camundongos, filhotes de mães que ingeriram uma dieta hiperlipídica, a expressão de MOR e do ligante pré-proencefalina foi aumentada no núcleo accumbens, córtex pré-frontal e hipotálamo (NOGUEIRAS et al., 2012).

Portanto, esses dados indicam que o sistema opioidérgico é importante na manutenção da homeostase do peso corporal e do comportamento alimentar, sobretudo o comportamento alimentar hedônico. Essa relação sugere que uma disfunção nesse sistema pode ter um papel na fisiopatologia dos distúrbios do comportamento alimentar. Por isso, é importante compreender os efeitos da separação materna sobre esse sistema na tentativa de elucidar os mecanismos subjacentes às alterações do comportamento alimentar após o estresse precoce.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da separação materna sobre o tamanho da refeição com uma dieta palatável, com ou sem estresse alimentar agudo, e sobre a expressão gênica do receptor opioide MOR no hipotálamo.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar, em ratos jovens, submetidos ou não à separação materna:

- O tamanho da refeição (Kcal/Kg de peso corporal) com uma dieta palatável;
- O tamanho da refeição (Kcal/Kg de peso corporal) com uma dieta palatável após estresse alimentar agudo;
- A expressão gênica do receptor opioide MOR no hipotálamo.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* albinos da linhagem Wistar obtidos do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As fêmeas nulíparas e primíparas (250-300 g de peso corporal) permaneceram em Biotério de experimentação no Departamento de Anatomia da UFPE com temperatura de 22° C ($\pm$ 1°C), em 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 período de adaptação, os animais machos e fêmeas foram acasalados seguindo a proporção de duas fêmeas para um macho. Após sete dias junto com o macho, as fêmeas foram acomodadas em gaiolas individuais onde permaneceram com livre acesso à água e dieta e tiveram o peso corporal acompanhado para a confirmar a gestação. O dia de nascimento dos neonatos foi considerado o dia 0 e a manipulação para redução da ninhada foi realizada no 1° dia de vida. Após o ajuste das ninhadas, cada uma constituiu-se de oito ratos (machos e fêmeas, com o cuidado para não haver menos de 2 ratos do sexo oposto ao dominante).

4.2 Definição dos grupos experimentais e Separação materna

Inicialmente os grupos experimentais foram definidos levando-se em consideração a presença ou não da SM, formando dois grandes grupos: 1) Controle (C) e 2) Separados (SM), aquele em que os animais sofreram SM. Posteriormente, a partir desses dois grandes grupos de animais, foram formados mais dois subgrupos: aqueles que vivenciaram o estresse alimentar agudo ou não, denominados Controle com Estresse Alimentar (C+EA) e Separados com Estresse Alimentar (SM+EA), totalizando 4 grupos.

A separação materna teve início no segundo dia pós-natal (PND2), e durou 180 minutos cada sessão (das 8h às 11h), até o PND14 (DE SOUZA, 2020). Os filhotes foram mantidos em incubadoras com temperatura controlada de 30-32°C (PLOTSKY; MEANEY, 1993) e durante a fase de ciclo escuro. Os animais foram desmamados no PND21 e após o desmame, foram agrupados em gaiolas e separados por sexo, com dois a três animais em cada gaiola, com acesso livre à dieta e água, até o início dos testes. Para esse estudo apenas os ratos machos foram utilizados.

4.3 Tamanho da refeição com e sem estresse

Aos 35 dias de vida, ofereceu-se um alimento palatável (Cookie Chocolate Bauducco®) com peso e quantidade conhecidos durante 1 hora no ciclo escuro, a fim de averiguar o tamanho da refeição. Tal medida diz respeito à quantidade de calorias ingeridas por Kg de peso corporal do animal (Kcal/Kg de peso corporal). Para isso, foi pesada a quantidade rejeitada após a ingestão durante 1h e, então, através da diferença entre a quantidade ofertada e o rejeito, a quantidade ingerida foi calculada. O peso do animal foi avaliado antes da ingestão, e posteriormente à ingestão, com o peso e quantidade ingerida foi feito o cálculo do tamanho da refeição, considerando que o Cookie possui 4,37 Kcal/g. Para o tamanho da refeição após estresse alimentar, o mesmo procedimento foi realizado após 30 minutos de exposição ao agente estressor.

4.4 Estresse alimentar agudo e eutanásia

No 36º dia de vida, durante o ciclo escuro, foi realizado o estresse alimentar agudo, tanto no grupo controle quanto no separado. Esse modelo de estresse é baseado na exposição olfativa e visual durante um período de 30 minutos a um alimento palatável (Cookie Chocolate Bauducco®). O cookie permaneceu envolto por uma rede de material metálico, a qual impediu o acesso do animal ao alimento. Após esse período de estresse alimentar, o animal seguiu para a eutanásia.

4.5 Análise da expressão gênica do receptor opioidérgico μ no hipotálamo

4.5.1 Eutanásia e obtenção do hipotálamo

A eutanásia ocorreu durante a fase escura (12h) através de decapitação utilizando a guilhotina. Um grupo não experimentou o estresse e o outro experimentou 30 minutos de estresse alimentar agudo imediatamente antes da decapitação. A cabeça foi dissecada e o crânio aberto para que se retirasse o encéfalo. Ele foi dissecado para obtenção do hipotálamo, o qual foi acondicionado em tubo plástico apropriado (ependorf) e imediatamente armazenado em um freezer a uma temperatura de -20°C até o momento das análises.

4.5.2 Análise da expressão gênica

Os hipotálamos foram processados para análise da expressão gênica do receptor μ opióide através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi realizado o experimento de PCR em tempo real com as amostras seguindo as etapas descritas resumidamente a seguir: 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). Posteriormente, as amostras de RNA foram tratadas com solução de gDNA Wipeout (Qiagen®, Hilden, Alemanha) para remoção eficaz da contaminação do DNA genômico durante 2 minutos a 42°C, e então armazenadas em gelo. Seguidamente, 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 minutos. A enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a uma temperatura de -20°C até a sua utilização.

Em seguida, foi utilizada 5 µl de cada amostra diluída de cDNA como template para a amplificação por PCR em tempo real, utilizando SYBR Green (Qiagen®, Hilden, Alemanha), como fluoróforo intercalante. Foi utilizado 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 minutos a 95°C seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 95°C, e 10 segundos a 60°C.

Tabela 1: Sequência de primers utilizados no estudo.

Primers	Forwards	Reverse
<i>β2M</i>	TGA CCG TGA TCT TTC TGG TG	ACT TGA ATT TGG GGA GTT TTC TG
<i>MOR</i>	CAA CCT CGT CCA CGA TCG AA	CCA GTT AGG GAC ATG GAG CA

4.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão da média (DPM). Para comparações múltiplas, foi utilizada ANOVA One Way, com pós-teste de Bonferroni, assumindo níveis de significância como $p < 0,05$. A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism® (Graph Pad Software, Inc, 2007).

5 RESULTADOS

5.1 Tamanho da refeição

O grupo de animais separados (SM) não apresentou alteração no tamanho da refeição com uma dieta palatável (C: $38,35 \pm 8,84$ vs SM: $38,38 \pm 9,45$, $n=10$, $p > 0,05$). Também não foi demonstrada mudança no tamanho da refeição no grupo separados com estresse alimentar (SM+EA) (SM: $38,38 \pm 9,45$ vs SM+EA: $38,84 \pm 10,33$, $n=10$, $p > 0,05$). Por outro lado, verificou-se no grupo controle com estresse alimentar (C+EA) aumento no tamanho da refeição (C: $38,35 \pm 8,84$ vs C+EA: $84,64 \pm 9,36$, $n=$, $p = 0,002$), resultado que não foi observado no grupo controle (C) (Figura 1).

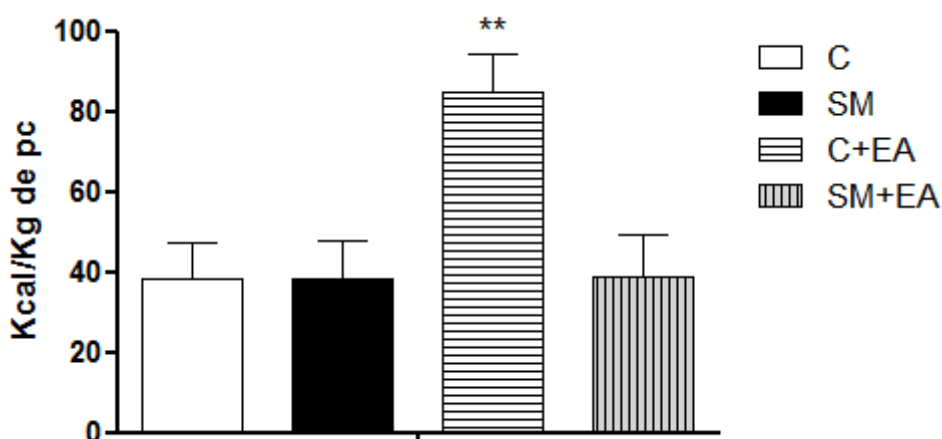


Figura 1. Efeitos da separação materna sobre o tamanho da refeição com alimento palatável (cookie) após estresse alimentar. C: Grupo Controle. SM: Grupo Separados. C+EA: Grupo Controle com Estresse Alimentar. SM+EA: Grupo Separados com Estresse Alimentar. ANOVA One Way. Dados expressos em Média $\pm$ Erro padrão da média. ** $p = 0,0175$ vs C, SM e SM+EA. N de machos=8-10.

5.2 Expressão gênica do MOR no hipotálamo

No grupo separados (SM) não foi observada alteração na expressão gênica do MOR no hipotálamo (C: $1,00 \pm 0,54$ vs SM: $1,75 \pm 0,25$, $n=4-5$, $p > 0,05$).

Porém, no grupo separados com estresse alimentar (SM+EA), houve aumento da expressão. (SM: $1,75 \pm 0,25$ vs SM+EA: $18,66 \pm 0,39$, $n=$, $p < 0,0001$; C: $1,00 \pm 0,54$ vs C+EA: $1,25 \pm 0,46$, $n= 5$, $p > 0,05$) Esses resultados não foram verificados no grupo controle (C), nem no grupo controle com estresse alimentar (C+EA) (Figura 2).

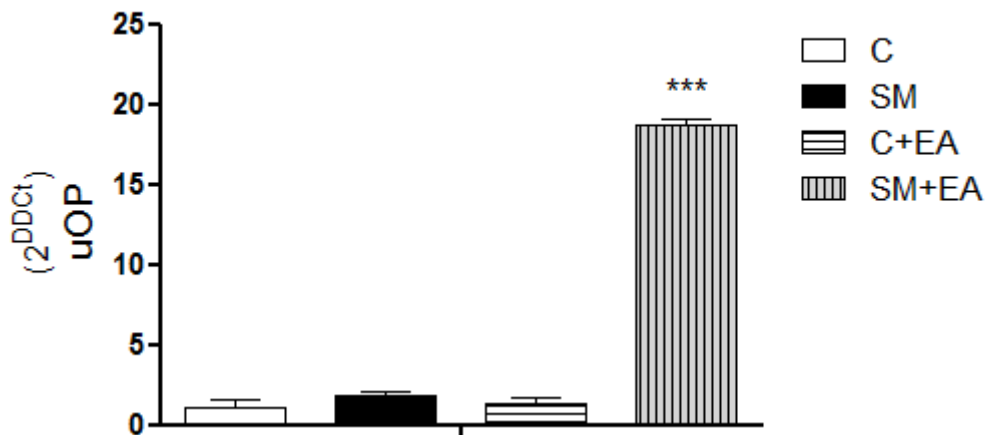


Figura 2. Efeitos da separação materna sobre a expressão gênica de MOR no hipotálamo após estresse alimentar. C: Grupo Controle. SM: Grupo Separados. C+EA: Grupo Controle com Estresse Alimentar. SM+EA: Grupo Separados com Estresse Alimentar. ANOVA One Way. Dados expressos em Média $\pm$ Erro padrão da média. *** $p = p < 0,0001$ vs C, SM e C+EA. N de machos=4.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a separação materna não alterou o tamanho da refeição com uma dieta palatável em ratos com 35 dias de vida. Contudo, após uma experiência estressora, o aumento esperado no tamanho da refeição, observado no grupo controle, não foi visto no grupo separado. Com relação à expressão gênica do receptor MOR no hipotálamo, apenas o grupo separado após estresse alimentar apresentou expressão aumentada.

A ausência de efeitos da separação materna sobre o tamanho da refeição, pode estar relacionada ao fato dessa ingestão ter sido realizada em condições basais, ou seja, condições padrão de biotério. A hipótese do "*two hit*" ("duplo-golpe"), ressalta a importância do ambiente no aparecimento dos resultados. Alfred G. Knudson, um geneticista e médico, foi reconhecido internacionalmente pela proposta dessa explicação na causa do retinoblastoma. Nela, propõe-se que, numa situação normal, as células saudáveis têm genes não danificados em dois cromossomos, em que um cromossomo é herdado do pai e o outro da mãe. Os organismos que apresentam a susceptibilidade de desenvolver o retinoblastoma são aqueles que recebem um "golpe" (dano) em genes de cada cromossomo. O primeiro dano pode ocorrer devido a uma mutação genética ocorrida num período crítico do desenvolvimento, como a gestação. Porém, também pode ocorrer num período posterior da vida, após o nascimento. Em ambos os casos, a célula que receber um dano nos genes dos dois cromossomos é aquela que poderá produzir o câncer (KNUDSON, 1971). Esse conceito tem sido desenvolvido e aplicado na área de estudo do estresse. Um exemplo de modelo "*two-hit*" nessa área, considera a exposição a um agente estressor em diferentes fases do desenvolvimento com um "duplo-golpe". Assim, o estresse da separação materna no início da vida seria o primeiro "golpe" e uma segunda exposição ao estresse mais tarde seria o segundo "golpe". A soma de ambos é que estaria associada a alterações moleculares e comportamentais (HILL et al., 2014b; DE SOUZA et al., 2020). De fato, tem sido demonstrado que em condições basais os animais separados nem sempre manifestam alterações comportamentais, como mudanças na ingestão dietética. Contudo, após uma segunda exposição ao estresse, as alterações se tornam evidentes, como o aumento da ingestão de alimento palatável visto nesses animais

(DE SOUZA et al., 2020). Portanto, a ausência de alterações no tamanho da refeição, observada no presente estudo, pode estar relacionado ao fato dos animais estarem em condições basais, sem terem tido uma segunda exposição ao estresse.

Nesse sentido, a segunda experiência com o estresse após o desmame, aumentou o tamanho da refeição no grupo controle. Esse aumento pode ter sido influenciado pela composição da dieta, a qual apresenta-se rica em açúcares simples e gordura. Alimentos com essa composição têm recebido a denominação de "*comfort food*" ("alimentos de conforto"). Eles são assim denominados por apresentarem a capacidade de diminuir a ativação do eixo responsável pela resposta fisiológica ao estresse, o eixo HPA (MARKUS et al., 2000; ZELLNER et al., 2006). Portanto, a maior ingestão observada no grupo controle após o estresse alimentar agudo pode estar associada à composição do cookie, rico em açúcares e gordura, com o objetivo de mitigar o desconforto causado pela experiência estressora.

Outro fator que pode ter influenciado o tamanho da refeição no grupo controle após o estresse alimentar é a natureza do agente estressor. Diferentes estressores causam variados efeitos na ingestão alimentar, e essa pluralidade de respostas se dá de acordo com a gravidade de cada tipo de estresse utilizado. Estressores graves e moderados, como a imobilização e o estresse por ruído, respectivamente, levam à diminuição da ingestão de alimentos comuns. Já estresses leves induzem ao aumento da ingestão de alimentos palatáveis, ricos em gordura e açúcar (TORRES; NOWSON, 2007).

O estresse alimentar agudo aplicado no presente estudo caracteriza-se como um agente estressor leve. O animal não possui o controle sobre o ambiente e, paralelamente, pode ocorrer uma ativação de circuitos neurais responsáveis por controlar o comportamento alimentar e a recompensa. Nesse cenário, há algumas vantagens na utilização desse modelo de estresse em relação a outros, como o choque elétrico nas patas, pois este não é capaz de gerar medo ou "congelamento" no rato. Sendo assim, leva a uma ativação comportamental que induz o animal à ingestão do alimento palatável. Ademais, essa experiência estressora está diretamente associada ao relacionamento entre o animal e o alimento, como ocorre geralmente em humanos (CIFANI et al., 2009). Por essas características, o estresse alimentar agudo utilizado no presente estudo pode ter estimulado a vontade por

ingerir o alimento palatável, resultando no maior tamanho da refeição observado no grupo controle.

Com relação aos animais separados, não foi observado um maior tamanho da refeição após o estresse alimentar, como no grupo controle. Esse resultado pode estar associado à resiliência ao estresse, condição que pode ser obtida após sofrer uma experiência estressora no início da vida. Isso se justifica com o estudo de SHI et al., 2021, no qual observou que animais que experimentaram a separação materna previsível, ou seja, aquela que ocorreu diariamente durante as duas primeiras semanas de vida do animal, no mesmo horário, apresentavam maior expressão de ocitocina no córtex pré-frontal medial (mPFC). Essa maior expressão foi um fator protetor contra a disfunção de sinapses glutamatérgicas e contra a ansiedade associada ao estresse, tornando esses animais resilientes. Esse efeito protetor foi anulado após nocaute do gene do receptor de ocitocina, indicando que a ocitocina é essencial para o desenvolvimento da resiliência ao estresse diário de separação materna. Além disso, foi verificado que a fonte da ocitocina do mPFC foi o núcleo paraventricular (PVN). Em vista disso, um bloqueio nas projeções ocitocinérgicas advindas do PVN, localizado no hipotálamo, para o mPFC, foi capaz de exacerbar o comportamento de ansiedade nos ratos que passaram pela separação materna previsível (SHI et al., 2021). Portanto, no presente estudo os animais separados parecem ter desenvolvido uma resiliência ao estresse, a qual pôde ser observada na não alteração do tamanho da refeição. Considerando-se que a ansiedade associada ao estresse leva à maior ingestão de dieta palatável (DE SOUZA et al., 2018), a resiliência protegeria esses animais dessa ansiedade e de sua hiperfagia.

No presente estudo foi possível observar que a expressão do receptor opioidérgico MOR foi alterada apenas após o estresse alimentar agudo nos animais separados, ou seja, o estresse é um importante fator para a expressão do MOR no hipotálamo. A relação entre estresse e sistema opioidérgico já está estabelecida na literatura. Os opioides têm sido descritos como mediadores da analgesia induzida por estressores (CONTET et al., 2006) e atuam na modulação da ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), aumentando ou diminuindo os níveis de hormônios do eixo (DEGLI UBERTI et al., 1995; NIKOLARAKIS et al., 1987; TSAGARAKIS et al., 1989; TSAGARAKIS et al., 1990; YAJIMA et al., 1986). Um

desses hormônios é o CRF. Foi demonstrado que a administração de agonista do receptor MOR inibe a liberação do CRF em ratos, demonstrando um papel dos opioides no *feedback* negativo da resposta ao agente estressor (DEGLI UBERTI et al., 1995; NIKOLARAKIS et al., 1987; TSAGARAKIS et al., 1989; TSAGARAKIS et al., 1990; YAJIMA et al., 1986). Assim, o aumento da expressão do MOR pode estar envolvido no *feedback* negativo do eixo HPA.

Vale ressaltar que esse aumento na expressão visa um controle através de mecanismos lentos, pois envolve alterações na transcrição gênica. A resposta de retroalimentação negativa para os glicocorticoides envolve mecanismos lentos genômicos e mecanismos rápidos não genômicos. Em estudo com animais *knockout* para as urocortinas (neuropeptídeos da família do CRF), foi demonstrado uma incapacidade desses animais de se recuperar da ansiedade mesmo 24h após a cessação do estímulo estressor. Isso sugere que a ativação desses receptores CRF atua na diminuição gradativa dos níveis de ansiedade associado ao estresse através de um mecanismo de ação lenta (NEUFELD-COHEN et al., 2010). Assim, embora o aumento da transcrição gênica, no presente trabalho, já tenha sido demonstrada 30 minutos após o início do estresse, uma possível atuação do MOR no *feedback* negativo ocorreria em longo prazo.

Neste estudo, em machos controle estressados, a expressão do MOR esteve baixa enquanto que o consumo se mostrou elevado. Por outro lado, em machos separados estressados a expressão do MOR foi elevada, mas o consumo foi menor, quando comparado aos animais controle estressados. Portanto, parece haver uma relação inversa entre a expressão molecular e a comportamental em que, altos níveis de MOR no hipotálamo bloqueiam a hiperfagia associada ao estresse. Como citado anteriormente, alimentos palatáveis têm sido referidos como *comfort foods*, devido a sua capacidade de reduzir a ativação do eixo HPA e, conseqüentemente, reduzir o estresse (MARKUS et al., 2000; ZELLNER et al., 2006). Assim, a relação inversa entre a expressão do MOR e o consumo de alimento palatável parece sugerir que o MOR no hipotálamo tem uma ação repressora sobre o estresse. Nesse caso, a maior expressão do receptor dispensaria a necessidade de maior ingestão de alimento palatável. Portanto, parece razoável afirmar que o grupo controle utiliza uma estratégia comportamental, a maior ingestão, como um "*coping behavior*" (comportamento de enfrentamento), enquanto que os animais separados, os quais

parecem ser resilientes ao estresse, utilizam uma estratégia molecular, a maior expressão gênica de MOR, para lidar com o estresse.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a separação materna, não altera o tamanho da refeição de ratos jovens, mesmo após o estresse alimentar agudo, aplicado posteriormente na vida. Porém, o grupo controle apresenta maior tamanho da refeição após essa experiência estressora. Quanto à expressão do receptor opioidérgico MOR, a separação materna não é capaz de provocar alterações. Contudo, o grupo separado apresenta a expressão gênica aumentada após sofrer o estresse alimentar.

Os resultados observados neste estudo auxiliam a elucidar os efeitos que o estresse no início da vida e estressores agudos experimentados posteriormente causam no comportamento alimentar e na expressão gênica de MOR, e como esse receptor pode modular a resposta ao estresse e, portanto, o consumo alimentar. Dessa forma, contribui para a compreensão dos mecanismos causadores dos distúrbios alimentares. Alterações nesse comportamento podem levar ao desenvolvimento de obesidade e demais doenças crônicas não transmissíveis, devido ao alto consumo de alimentos palatáveis, ricos em gordura e açúcar.

Um outro fator que o presente estudo destaca é a importância do período inicial da vida para a saúde na vida adulta. Dessa forma, iniciativas que protejam o organismo durante o seu período inicial são essenciais para o desenvolvimento pleno do indivíduo.

REFERÊNCIAS

BARKER, D. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease In england and wales. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077–1081, maio 1986.

BERTHOUD, H.-R. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 6, p. 888–896, dez. 2011.

BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior: 2008. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2432–2479, dez. 2009.

BORZADARAN, F. et al. Environmental enrichment and pain sensitivity; a study in maternally separated rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 80, n. 5, p. 347–353, 1 ago. 2020.

CALDJ, C.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 12, p. 1164–1174, dez. 2000.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374–381, 2 jul. 2009.

CIFANI, C. et al. A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine, fluoxetine, topiramate, and midazolam. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 1, p. 113–25, maio 2009.

CONDE-AGUDELO, A.; BELIZÁN, J. M.; DIAZ-ROSSELLO, J. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. Em: CONDE-AGUDELO, A. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011.

CONTET, C. et al. Dissociation of analgesic and hormonal responses to forced swim stress using opioid receptor knockout mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1733–1744, 9 ago. 2006.

CUI, Y. et al. Early-Life Stress Induces Depression-Like Behavior and Synaptic-Plasticity Changes in a Maternal Separation Rat Model: Gender Difference and Metabolomics Study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 26 fev. 2020.

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**, v. 5, n. 3, p. 219–228, 31 jun. 2014.

D'ARGENIO, A. et al. Early trauma and adult obesity: Is psychological dysfunction the mediating mechanism? **Physiology and Behavior**, v. 98, n. 5, p. 543–546, 7 dez. 2009.

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

DE SOUZA, J. A. et al. Dual exposure to stress in different stages of development affects eating behavior of male Wistar rats. **Physiology and Behavior**, v. 214, 1 fev. 2020.

DEGLI UBERTI, E. C. et al. Involvement of μ -opioid receptors in the modulation of pituitary-adrenal axis in normal and stressed rats. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 9 jan. 1995.

FERENCZI, S. et al. Changes in metabolic-related variables during chronic morphine treatment. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 3, p. 323–330, out. 2010.

GIULIANO, C.; COTTONE, P. The role of the opioid system in binge eating disorder. **CNS Spectrums**, v. 20, n. 6, p. 537–545, 26 dez. 2015.

GOLDSTONE, A. P. et al. Fasting biases brain reward systems towards high-calorie foods. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 1625–1635, out. 2009.

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**, v. 81, n. 3, p. 506–516, jul. 2005.

HABIB, K. E.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. NEUROENDOCRINOLOGY OF STRESS. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 695–728, set. 2001.

HILL, R. A. et al. Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a “two hit” rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. **Hippocampus**, v. 24, n. 10, p. 1197–1211, out. 2014a.

HILL, R. A. et al. Long-term effects of combined neonatal and adolescent stress on brain-derived neurotrophic factor and dopamine receptor expression in the rat forebrain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 11, p. 2126–2135, nov. 2014b.

KNUDSON, A. G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 4, p. 820–823, abr. 1971.

KOCH, F. S.; SEPA, A.; LUDVIGSSON, J. Psychological Stress and Obesity. **Journal of Pediatrics**, v. 153, n. 6, 2008.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 5, p. 717–728, jun. 2010a.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: Role of hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 10, p. 1553–1564, nov. 2010b.

MARTINS CORTEZ, C.; SILVA, D. Implicações do estresse sobre a saúde e a doença mental. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n. 4, p. 96-108, dez. 2007.

MARKUS, R. Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. **Physiology & Behavior**, v. 70, n. 3–4, p. 333–342, set. 2000.

MCINTOSH, J.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. **Developmental Brain Research**, v. 113, n. 1–2, p. 97–106, mar. 1999.

MEIJER, O. C. et al. Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT_{1A} receptor-mediated behavioural responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 351, n. 1, p. 7–14, jun. 1998.

MEIJER, O. C.; DE KLOET, E. R. Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. **Critical reviews in neurobiology**, v. 12, n. 1–2, p. 1–20, 1998.

MICHAELS, C. C.; HOLTZMAN, S. G. Enhanced sensitivity to naltrexone-induced drinking suppression of fluid intake and sucrose consumption in maternally separated rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 4, p. 784–796, abr. 2007.

MORALES, I.; BERRIDGE, K. C. 'Liking' and 'wanting' in eating and food reward: Brain mechanisms and clinical implications. **Physiology & Behavior**, v. 227, p. 113152, 1 dez. 2020.

MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions*. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 25–44, jan. 1984.

NEUFELD-COHEN, A. et al. A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 44, p. 19020–19025, 2 nov. 2010.

NIKOLARAKIS, K. et al. The role of CRF in the release of ACTH by opiate agonists and antagonists in rats. **Brain Research**, v. 421, n. 1–2, p. 373–376, set. 1987.

NOGUEIRAS, R. et al. The Opioid System and Food Intake: Homeostatic and Hedonic Mechanisms. **Obesity Facts**, v. 5, n. 2, p. 196–207, 2012.

ODEON, M. M.; ACOSTA, G. B. Repeated maternal separation: Alcohol consumption, anxious behavior and corticosterone were reversed by a non-pharmacological treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 95, p. 109726, dez. 2019.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502–548, 1 ago. 2001.

PAPADAKAKIS, A.; SIDIROPOULOU, K.; PANAGIS, G. Music exposure attenuates anxiety- and depression-like behaviors and increases hippocampal spine density in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112023, out. 2019.

PHILLIPS, G. B. Endogenous Sex Hormones and Type 2 Diabetes Risk. **JAMA**, v. 296, n. 2, p. 165, 12 jul. 2006.

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. 485–493, 1993.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, v. 18, n. 3, p. 195–200, maio 1993.

ROCCHI, G. et al. Opioidergic System and Functional Architecture of Intrinsic Brain Activity: Implications for Psychiatric Disorders. **The Neuroscientist**, v. 26, n. 4, p. 343–358, 5 ago. 2020.

RUI, L. Brain regulation of energy balance and body weight. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 14, n. 4, p. 387–407, dez. 2013.

RYU, V. et al. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. **Brain Research**, v. 1295, p. 127–134, 12 out. 2009.

SASAKI, T. Neural and Molecular Mechanisms Involved in Controlling the Quality of Feeding Behavior: Diet Selection and Feeding Patterns. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1151, 20 out. 2017.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, 6 abr. 2000.

SHI, D.-D. et al. Predictable maternal separation confers adult stress resilience via the medial prefrontal cortex oxytocin signaling pathway in rats. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 12, p. 7296–7307, 24 dez. 2021.

SMITH, D. F.; TOFT, D. O. Steroid receptors and their associated proteins. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 4–11, jan. 1993.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 3, p. 266–269, 5 jun. 2018.

TIMPER, K.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 10, n. 6, p. 679–689, 1 jun. 2017.

TORRES, S. J.; NOWSON, C. A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v. 23, n. 11–12, p. 887–894, nov. 2007.

TRITOS, N. et al. Neurotransmitter Modulation of Glucocorticoid Receptor mRNA Levels in the Rat Hippocampus. **Neuroendocrinology**, v. 69, n. 5, p. 324–330, 1999.

TSAGARAKIS, S. et al. Morphine Directly Modulates the Release of Stimulated Corticotrophin-Releasing Factor-41 from Rat Hypothalamus *in Vitro*. **Endocrinology**, v. 124, n. 5, p. 2330–2335, maio 1989.

TSAGARAKIS, S. et al. Opiate Receptor Subtype Regulation of CRF-41 Release from Rat Hypothalamus in vitro. **Neuroendocrinology**, v. 51, n. 5, p. 599–605, 1990.

TSIGOS, C. et al. Stress: Endocrine Physiology and Pathophysiology. **Endotexto [Internet]**, 2000.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 13 jun. 2009.

WADHWA, P. et al. Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 05, p. 358–368, 26 set. 2009.

WILLIAMS, G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 683–701, nov. 2001.

YAJIMA, F. et al. Effects of opioid peptides on immunoreactive corticotropin-releasing factor release from the rat hypothalamus in vitro. **Life Sciences**, v. 39, n. 2, p. 181–186, jul. 1986.

ZELLNER, D. A. et al. Food selection changes under stress. **Physiology and Behavior**, v. 87, n. 4, p. 789–793, 15 abr. 2006.