

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**LUANA CRUZ BELTRÃO**

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A ANSIEDADE E  
PARÂMETROS DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATAS: papel do  
sistema serotoninérgico.**

**RECIFE**

**2021**

**LUANA CRUZ BELTRÃO**

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A ANSIEDADE E  
PARÂMETROS DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATAS: papel do  
sistema serotoninérgico.**

Dissertação de Mestrado da área de Bases Experimentais da Nutrição apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Sandra Lopes de Souza

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Julliet Araújo De Souza

**RECIFE**

**2021**

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Beltrão, Luana Cruz.

Efeitos do desmame precoce sobre a ansiedade e parâmetros do comportamento alimentar em ratas: papel do sistema serotoninérgico / Luana Cruz Beltrão. - Recife, 2021.

68f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2021.

Orientação: Sandra Lopes de Souza.

Coorientação: Julliet Araújo de Souza.

Inclui referências.

1. Desmame precoce; 2. Fêmeas; 3. Serotonina; 4. Fluoxetina; 5. Ansiedade; 6. Comportamento alimentar. I. Souza, Sandra Lopes de. II. Souza, Julliet Araújo de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

**LUANA CRUZ BELTRÃO**

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A ANSIEDADE E  
PARÂMETROS DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATAS: papel do  
sistema serotoninérgico.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Sandra Lopes de Souza

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Julliet Araújo de Souza

**Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Matilde Cesiana da Silva**

**Universidade Federal de Pernambuco - CAV**

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Lisiane dos Santos Oliveira**

**Universidade Federal de Pernambuco - CAV**

---

**Prof. Dr. Rafael Danyllo da Silva Miguel**

**Universidade Federal de Alagoas**

## RESUMO

Insultos no início da vida parecem ter consequências permanentes na idade adulta. Dentre eles, o desmame precoce tem sido associado a alterações do controle do comportamento alimentar e do similar à ansiedade. Esses comportamentos recebem influência do sistema serotoninérgico na sua regulação. As alterações dos mecanismos de regulação desses comportamentos têm sido associadas à obesidade e suas comorbidades. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar, em ratas fêmeas adultas, os efeitos do desmame precoce sobre parâmetros do comportamento alimentar e do similar à ansiedade, e a participação do sistema serotoninérgico nesses. Os animais foram desmamados aos 15 ou 30 dias de vida para formação dos grupos. Após o desmame, os animais permaneceram em condições padrão de biotério até o início dos experimentos. A medição do peso corporal foi realizada entre os dias 194 e 200 de vida pós-natal. O teste de labirinto em cruz elevado, com e sem a administração da fluoxetina, foi realizado entre 194 e 196 dias de vida e a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS), com alimentos palatáveis e dieta padrão, com e sem a administração de fluoxetina, por volta dos 200 dias de vida. Os resultados mostraram que o desmame precoce não alterou o peso corporal quando comparado ao grupo controle (C:  $241,87 \pm 20,98$  vs D:  $252,87 \pm 19,2$ , n=8, p>0,05). Com relação ao teste do labirinto em cruz elevado, o desmame precoce não mostrou alterações no tempo de permanência nos braços abertos (C:  $66,14 \pm 50,07$ , n=7 vs D:  $83,25 \pm 69,64$ , n=8, p>0,05) e braços fechados (C:  $208,71 \pm 64,67$ , n=7 vs D:  $185,37 \pm 88,08$ , n=8, p>0,05). Mesmo após a administração de fluoxetina (braço aberto: C:  $5,43 \pm 8,04$ , n=7 vs D:  $11,12 \pm 25,8$ , n=8, p>0,05 e braço fechado: C:  $284,14 \pm 14,71$ , n=7 vs D:  $271,125 \pm 48,1$ , n=8, p>0,05). Com relação ao consumo alimentar, o desmame precoce não alterou o consumo de dieta padrão ou palatável, mas esteve associado à diminuição da latência para iniciar uma refeição com alimento palatável, mesmo após aplicação da fluoxetina, uma droga anorexígena (D30+C fluox:  $141,37 \pm 80,28$  vs D15+C fluox:  $5,87 \pm 3,28$ , n=8, p>0,001). O desmame precoce também esteve associado a uma menor duração da refeição com alimento palatável (D30+C salina:  $1400,9 \pm 176,8$  vs D15+C salina:  $781,6 \pm$

100,4, n=8, p<0,01), bem como à uma menor taxa alimentar de dieta padrão após a administração de fluoxetina (D15+DP salina:  $2,384 \pm 0,526$  vs D15+DP fluox:  $1,143 \pm 0,08$ , n=8, p<0,05), porém não reduziu o tamanho da refeição após droga anorexígena quando o alimento foi o cookie. Além disso, o desmame precoce esteve associado à antecipação ponto de saciedade e também deste sob ação da fluoxetina, em que houve atraso na saciedade. Portanto, embora as fêmeas desmamadas precocemente pareçam resistentes aos efeitos do desmame precoce sobre parâmetros do comportamento similar à ansiedade e do consumo alimentar, uma análise detalhada mostra que o desmame precoce pode acarretar mudanças comportamentais, que podem ser vistas após manipulação do sistema serotoninérgico, as quais podem ser prejudiciais em longo prazo.

**Palavras-chave:** Desmame precoce, Fêmeas, Serotonina, Fluoxetina, Ansiedade, Comportamento alimentar.

## ABSTRACT

Events in the early stages of life are known to influence the behavior of adult individuals. Among them, early weaning has been associated with changes in the control of eating and anxiety-like behavior, these behaviors are influenced by the serotonergic system in its regulation. Changes in the regulatory mechanisms of these behaviors have been associated with obesity and associated diseases. Therefore, the aim of the present work was to investigate, in adult female rats, the effects of early weaning on parameters of feeding and anxiety-like behavior, and the participation of the serotonergic system. The animals were weaned at the 15th or 30th day of life to form groups. After weaning, the animals remained in standard conditions until the beginning of the experiments. Body weight measurement was performed between 194 and 200 days. The elevated plus-maze test, with and without the administration of fluoxetine, was performed between 194 and 196 days of life and the Satiety Behavior Sequence (SCS), with palatable foods and standard diet, with and without the administration of fluoxetine, around 200 days old. The results showed that early weaning did not change body weight when compared to the control group (C:  $241,87 \pm 20,98$  vs E:  $252,87 \pm 19,2$ , n=8, p>0,05). Regarding the elevated plus-maze test, early weaning did not show changes in the length of stay in the open arms (C:  $66,14 \pm 50,07$ , n=7 vs E:  $83,25 \pm 69,64$ , n=8, p>0,05) and closed arms (C:  $208,71 \pm 64,67$ , n=7 vs E:  $185,37 \pm 88,08$ , n=8, p>0,05). Even after the administration of fluoxetine, open arms: (C:  $5,43 \pm 8,04$ , n=7 vs E:  $11,12 \pm 25,8$ , n=8, p>0,05) and closed arms: (C:  $284,14 \pm 14,71$ , n=7 vs E:  $271,125 \pm 48,1$ , n=8, p>0,05). Regarding food consumption, early weaning did not change the consumption of a standard or palatable diet, but it was associated with a decrease in the latency to start a meal with palatable food, even after application of fluoxetine, an anorectic drug (D30+C fluox:  $141,37 \pm 80,28$  vs D15+C fluox:  $5,87 \pm 3,28$ , n=8, p>0,001). Early weaning was also associated with shorter meal duration with palatable food (D30+C saline:  $1400,9 \pm 176,8$  vs D15+C saline:  $781,6 \pm 100,4$ , n=8, p<0,01), as well as a lower standard diet feeding rate after fluoxetine administration (D15+SD saline:  $2,384 \pm 0,526$  vs D15+SD fluox:  $1,143 \pm 0,08$ , n=8, p<0,05), however it did not reduce the size of the meal after anorectic drug when the food was cookies. In

addition, early weaning was associated with an alteration of the anticipation point of satiety and also of this under the action of fluoxetine, in which satiety was delayed. Therefore, although early weaned females seem resistant to the effects of early weaning on anxiety-like behavioral parameters and food consumption, detailed analysis shows that early weaning can lead to behavioral changes which can be seen after manipulation of the serotonergic system, which can be harmful in the long term.

**Keywords:** Early weaning, Females, Serotonin, Fluoxetine, Anxiety, Eating behavior.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. Plasticidade fenotípica .....	14
2.2. Aleitamento materno .....	16
2.3. Desmame precoce em humanos .....	18
2.4. Desmame precoce em animais .....	19
2.5. Ansiedade .....	20
2.6. Ansiedade e comportamento alimentar .....	22
2.7. Comportamento alimentar homeostático .....	24
2.8. Comportamento alimentar hedônico.....	27
2.9. Desmame precoce e comportamento alimentar .....	29
3. HIPÓTESE .....	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1. Geral .....	32
4.2. Específicos.....	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1. Animais experimentais .....	33
5.2. Desmame precoce e formação dos grupos experimentais.....	33
5.3. Grupos experimentais .....	34
5.4. Peso corporal .....	35
5.5. Labirinto em cruz elevado .....	35
5.6. Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) .....	36
5.7. Aspectos éticos .....	37
5.8. Análises estatísticas.....	37
6. RESULTADOS .....	38
6.1. PESO CORPORAL .....	38
6.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	38
6.3. CONSUMO ALIMENTAR NO TESTE DE SCS.....	39
6.4. LATÊNCIA PARA INICIAR A REFEIÇÃO NO TESTE DE SCS.....	41
6.5. DURAÇÃO DA REFEIÇÃO NO TESTE DE SCS.....	42
6.6. TAXA DE ALIMENTAÇÃO NO TESTE DE SCS .....	43

6.7. TAMANHO DA REFEIÇÃO NO TESTE DE SCS .....	44
6.8. PONTO DE SACIEDADE NO TESTE DE SCS .....	45
7. DISCUSSÃO .....	47
8. CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIAS .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

O desmame precoce tem sido associado a maiores riscos para mortalidade infantil (SANKAR, et al., 2015). Pesquisas mostram que bebês amamentados por menor tempo têm maior susceptibilidade para doenças gastrointestinais, otite, doenças respiratórias e doenças atópicas (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2012), bem como maior risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015). Por outro lado, a amamentação com maior duração tem efeito protetor sobre o risco de sobrepeso e obesidade (FORNARI; BRUSATI; MAFFEIS, 2021), além de um impacto positivo no desenvolvimento cognitivo do indivíduo (HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015).

A Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida e manutenção da amamentação até o segundo ano de vida ou mais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). E a baixa prevalência do aleitamento materno exclusivo tem sido associada à baixa escolaridade das mães, à idade materna (<20 anos) e a mães que trabalham fora de casa (BRASIL, 2009).

Sabe-se que, além da importância para nutrição (WHO, 2009) e proteção contra infecções no bebê (SANKAR, et al., 2015), é durante a lactação que ocorre o desenvolvimento neurocomportamental (HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015), sendo esse período, portanto, considerado um período crítico no desenvolvimento do indivíduo (KRECEK, 1970). O modelo de desmame precoce em animais, no qual os filhotes são separados das mães antes da idade adequada do desmame, tem se mostrado associado a alterações dos padrões do comportamento similar à ansiedade e respostas elevadas ao estresse na idade adulta (KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004; NAKAMURA; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2007), bem como alterações do comportamento alimentar (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011; TAVARES, et al., 2020; DO AMARAL ALMEIDA, et al., 2021; SOARES, et al., 2021). Entretanto, são estudos realizados em sua maioria apenas com animais machos, fazendo-se necessária a investigação desses comportamentos em ratas fêmeas.

A ansiedade pode ser definida como uma resposta não específica a ameaças potenciais vagas (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Em animais, esse comportamento é denominado “similar à ansiedade” e pode ser medido através do teste de labirinto em cruz elevado (MCNAUGHTON; ZANGROSSI, 2008). Este labirinto foi proposto por Handley e Mithani (HANDLEY; MITHANI, 1984) e é constituído de dois braços abertos e dois braços fechados que se estendem a partir de uma plataforma central comum, elevados a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso. Este modelo experimental é baseado no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados (HANDLEY; MITHANI, 1984). Estudos mostram que os animais desmamados precocemente apresentam uma resposta elevada, ou seja, maior tempo de permanência nos braços fechados, quando avaliado o comportamento similar à ansiedade em teste de labirinto (KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004; NAKAMURA; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2007).

O sistema serotoninérgico também está associado a esse comportamento. Em particular, a disfunção da enzima triptofano hidroxilase (TPH), do transportador de serotonina (SERT) ou do receptor 5-HT1A pode induzir comportamentos em roedores que estão associados à ansiedade e depressão (O'LERAY; CONDAGNONE; CRYAN, 2020). Entretanto, esses mecanismos não se associam de forma simples. Ao longo do tempo a introdução de novos agentes de ação serotoninérgicos no estudo da ansiedade resultou em resultados inconsistentes, isso pode se dar por, principalmente, dois motivos: (1) As drogas de ação sistêmica podem ter efeitos complexos, e (2) Os modelos experimentais são comumente mistos e abrangem um conjunto de sistemas neurobiológicos envolvidos na resposta de diferentes classes de transtorno de ansiedade (GRAEFF, 2008). Especificamente, os inibidores da recaptação de serotonina (SSRIs) causariam a resposta ansiogênica inicial relatada por alguns pacientes, aumentando agudamente a neurotransmissão de 5-HT2C. Com o tratamento repetido, a regulação negativa desses receptores em áreas límbicas, como a amígdala, juntamente com o aumento da neurotransmissão pós-sináptica mediada por 5-HT1A, diminuiria a ansiedade (GRAEFF, 2008). No entanto, a questão sobre quais áreas e receptores estão envolvidos nos distintos transtornos de ansiedade que respondem a essa classe de drogas permanece (GRAEFF, 2008).

Esse comportamento também tem sido associado à obesidade (OGRODNIK, et al., 2019). Um dos mecanismos pelos quais esses fatores podem estar associados é pelo comportamento alimentar induzido pelo estresse (DALLMAN, 2010). Em circunstâncias laboratoriais, observou-se que o estresse físico ou emocional agudo foi capaz de induzir o aumento da ingestão de alimentos de "conforto" em humanos e animais (DALLMAN, 2010). Estudos em humanos hipotetizam que transtornos de ansiedade tendem a preceder o desenvolvimento de transtornos alimentares, através da supressão expressiva como uma estratégia de regulação da emoção, ou seja, a emoção negativa não expressa é deslocada para o corpo, promovendo assim sintomas de alimentação desordenada (MCLEAN, et al., 2007).

Os períodos iniciais do desenvolvimento, que abrangem a vida intrauterina e os primeiros anos de vida pós-natal, se constituem em um momento de complexo processo de formação e maturação do sistema nervoso central (SCN) (HÜPPI, 2010). Portanto, frente a uma situação adversa que demande uma adaptação, como no desmame precoce, podem ocorrer alterações nas rotas de desenvolvimento, com impactos na formação de redes neurais, gerando alterações no comportamento permanentes na vida adulta (KEUNEN; COUNSELL; BENDERS, 2017). Além da ansiedade, outro comportamento que tem se mostrado alterado em animais desmamados precocemente é o comportamento alimentar, que atualmente tem sido bastante estudado tendo em vista dos crescentes números de quadros de obesidade nas últimas décadas (SWINBURN, et al., 2011).

Quanto ao comportamento alimentar desses animais foi observado um menor tempo de reatividade à sacarose e maior ingestão de alimentos palatáveis, revertido com droga opioidérgica (DO AMARAL ALMEIDA, et al., 2021). Além disso, esses animais apresentam uma preferência alimentar à gordura e açúcar apenas em animais machos (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011; SOARES et al., 2021), bem como a hiperfagia frente à dieta palatável e padrão (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011; SOARES et al., 2021). Esses animais também apresentaram uma alteração no ritmo de alimentação, com aumento da ingestão alimentar na fase clara e diminuição da ingestão alimentar na fase escura (TAVARES, et al., 2020). Entretanto, os estudos citados avaliaram esse comportamento, em sua maioria, apenas em animais

machos, fazendo-se necessária uma maior investigação desse comportamento em ratas fêmeas.

Portanto o estudo das consequências comportamentais, do comportamento similar à ansiedade e do comportamento alimentar, na vida adulta de ratas que foram desmamadas precocemente, bem como o impacto do sistema serotoninérgico na regulação desses comportamentos nesses animais, podem fornecer bases para compreender como o insulto que possa vir a ocorrer no início da vida, pode propiciar uma maior vulnerabilidade para o desenvolvimento de patologias na vida adulta.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Plasticidade fenotípica

O complexo processo de formação e maturação do sistema nervoso central (SNC) tem início na vida intrauterina e se estende até a vida adulta. Esse crescimento e desenvolvimento tem seu ápice no início da vida dos mamíferos (HÜPPI, 2010). Apesar de dispor de mecanismos de defesa para insultos e injúrias que possam vir a ocorrer nessa fase (MEEUSEN, 2017), o SNC também se mostra bastante sensível a adversidades nesse período, podendo acarretar em grandes impactos na formação das redes neurais, gerando alterações no comportamento permanentes na vida adulta de um indivíduo (KEUNEN; COUNSELL; BENDERS, 2017).

Essas alterações ocorrem devido à capacidade que o SNC tem de se adaptar às adversidades. Essa capacidade é denominada de plasticidade (KOLB, 2018) e ocorre desde a fase pré e pós-natal, continua ao longo da adolescência e na idade adulta jovem. Entretanto, é no período pré e pós-natal de desenvolvimento que se encontra aumentada (ISMAIL; FATEMI; JOHNSTON, 2017). Ela ocorre porque a maioria das espécies habita ambientes diversos e heterogêneos aos quais se adaptam por seleção natural e, como resultado, frequentemente passam por mudanças morfológicas, comportamentais e genéticas de forma gradual que, em muitas vezes, coincidem com a variação ambiental. O grau de adaptação de uma população a um determinado local pode ser definido por quanto próximo seu fenótipo está desse local. A plasticidade fenotípica, há muito, é reconhecida como uma propriedade presente em todos os organismos, em que um único genótipo pode expressar diferentes fenótipos em diferentes ambientes (SCHMID; GUILLAUME, 2017).

A plasticidade se apresenta em três tipos distintos, a depender do fator causal. A primeira seria quando o processo ocorre independente da experiência. Alguns neurônios que foram ativos juntos aumentam suas conexões, enquanto outros que não foram ativos enfraquecem suas conexões. Esse processo ocorre naturalmente e não depende de experiências. A segunda seria a plasticidade expectante de experiência (do inglês, *experience-expectant*). Esta ocorre, principalmente, durante o desenvolvimento pós-natal

inicial. No início da vida, os bebês podem discriminar os sons da fala de todos os idiomas, mas, ao longo do primeiro ano, o sistema auditivo começa a mudar de tal forma que o bebê se especializa em discriminar sons em seu ambiente particular de linguagem, mas perde a capacidade de discriminar sons fora desse ambiente (sons próprios de outros idiomas). Portanto, é uma plasticidade que aguarda experiências para se estabelecer. Por último, há a plasticidade dependente da experiência, a qual começa no início da vida pós-natal e continua por toda a vida. É um processo pelo qual as conexões neuronais são modificadas pela experiência (KOLB; HARKER; GIBB, 2017).

A plasticidade e o desenvolvimento prolongado do cérebro fornecem uma oportunidade para a modificação contínua da função cognitiva, mas, além disso, criam uma susceptibilidade potencial à formação de circuitos anormais que levam ao comprometimento da fisiologia e do comportamento (KOLB; MYCHASIUk; GIBB, 2014. Portanto, as modificações podem favorecer (adaptativas) ou prejudicar (mal-adaptativas) o funcionamento do organismo. Uma resposta plástica é considerada "adaptativa" quando permite que os genótipos expressem fenótipos mais próximos do ambiente, caso contrário é chamada de "não adaptativa". Numerosos exemplos de plasticidade adaptativa e mal-adaptativa existem na natureza (SCHMID; GUILLAUME, 2017). Entretanto, mesmo a plasticidade fenotípica adaptativa pode ter um custo, o qual pode incluir custos de manutenção (estrutura sensorial, mecanismo de regulação metabólica da plasticidade), de produção (uma estrutura desenvolvida por plasticidade pode ser mais dispendiosa do que uma determinada geneticamente), de informação (o processo pode ser arriscado, ou requerer energia, ou reduzir a eficiência de alimentação ou reprodução), de desenvolvimento impreciso (mudança plástica inespecífica), custos genéticos (ligação genética com alelos deletérios em outros *loci*, pleiotropia e epistasia), e custos ecológicos (interação entre espécies, por exemplo, a resposta plástica à herbivoria reduz a atratividade para polinizadores) (GRENIER; BARRE; LITRICO, 2016).

Os mecanismos que estão por trás das modificações da plasticidade fenotípica são, principalmente, de natureza epigenética. As alterações epigenéticas podem ser definidas como mudanças nos resultados do desenvolvimento, incluindo a regulação da expressão genética, e são

baseadas em mecanismos além do próprio DNA como, por exemplo, a alteração da expressão do gene, sem alteração do gene em si, em resposta a alguma demanda ambiental, acarretando em alterações organizacionais no sistema nervoso (KOLB; MYCHASIUk; MUHAMMAD; GIBB, 2013). Sendo assim, a epigenética está intimamente relacionada com o aumento de variabilidade fenotípica dos indivíduos (SALVATO; LABATE, 2021). E, portanto o fenótipo pode ser entendido como a manifestação de características observáveis como traços físicos e comportamentais (JUNIOR; DE TOLEDO NERIS; DE OLIVEIRA, 2018). Dentre as informações ambientais que podem acarretar modificações fenotípicas, estão aquelas relacionadas à interação mãe-filho, como o aleitamento materno.

## **2.2. Aleitamento materno**

A Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida e manutenção da amamentação até o segundo ano de vida ou mais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). O colostro e o leite materno são as primeiras fontes de nutrição que um recém-nascido recebe e são importantes para proteção e função imunoestimuladora do intestino do bebê (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2012). A amamentação tem sido associada à baixa incidência de inflamação gastrointestinal e à diminuição das doenças respiratórias no período pós-natal e, portanto, achados recentes têm associado o leite materno a um papel protetor no início vida, podendo gerar uma proteção direta contra a infecção por SARS-CoV-2 ou indireta, pelo alívio dos sintomas de COVID-19 (VASQUES DA COSTA; PURCELL GOES; GAMA, 2021).

Além do aspecto nutricional, a relação entre mães e bebês é entendida como de suma importância para o desenvolvimento infantil e, em última instância, para a sobrevivência da espécie (PARSONS, et al., 2020). Os humanos nascem imaturos e são totalmente dependentes para a regulação de seus processos fisiológicos, necessitando de um período de aleitamento mais prolongado do que o de outros mamíferos (VILLAR, et al., 2020). Esse é um período de plasticidade e vulnerabilidade do cérebro do recém-nascido e, por isso, o desenvolvimento humano inicial pode ser marcadamente influenciado

por fatores ambientais, incluindo os fatores nutricionais como a amamentação (VILLAR, et al., 2020).

Os efeitos positivos da amamentação têm sido atribuídos principalmente à saúde da criança, porém achados sugerem que as mães também podem se beneficiar da amamentação. Evidências mostram que o maior tempo de amamentação pode estar relacionado a um menor risco de diabetes tipo 2 materno. Estudos também sugerem maior sensibilidade à insulina e tolerância à glicose em mulheres que amamentam (JÄGER, et al., 2014).

Os Estados Membros da Organização Mundial da Saúde (OMS) acordaram seis Metas Globais para Nutrição. Uma meta é aumentar a taxa de aleitamento materno exclusivo (AME) nos primeiros 6 meses para, pelo menos, 50% até 2025, e outra meta é interromper o aumento do excesso de peso na infância (WHO, 2014). Bebês que são, predominantemente, alimentados com fórmula em comparação com aqueles que recebem exclusivamente leite materno nos primeiros 6 meses têm duas vezes e meia mais probabilidade de serem obesos aos 24 meses e a cessação do aleitamento materno exclusivo (AME) antes dos 4 meses aumenta o risco de obesidade infantil (SARKI; PARLESAK; ROBERTSON, 2019).

A obesidade infantil é uma questão de saúde cada vez mais preocupante em todo o mundo. A obesidade na infância é um fator de risco para muitas doenças crônicas em longo prazo. Um número crescente de crianças está sendo diagnosticado com obesidade e as comorbidades a ela associadas, incluindo diabetes tipo 2, hipertensão, doença renal crônica e apneia do sono. O risco para o surgimento de obesidade e suas complicações pode ser programado no início da vida - talvez até no útero - de acordo com a hipótese da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da doença (do inglês, *Developmental Origins of Health and Disease* - DOHaD), que postula que exposições pré-natais e pós-natais iniciais podem programar o metabolismo favorecendo o ganho de peso, bem como vias endócrinas e neurais (ARCHIBALD; DOLINSKY; AZAD, 2018).

Para diminuir o risco de desenvolvimento de obesidade infantil e outras patologias, o aleitamento materno tem sido incentivado.

### **2.3. Desmame precoce em humanos**

Em mamíferos, o desmame constitui uma fase essencial na progressão para a idade adulta. Descreve a transição do bebê da dependência completa da mãe para a independência nutricional e social e é acompanhada por mudanças marcantes no comportamento e na fisiologia da mãe e da prole (RICHTER, 2016). Embora tenha sido sugerido que o término completo da amamentação é uma característica chave desta fase, parece muito mais difícil, senão impossível, determinar o início e o fim exatos do processo de desmame na maioria das espécies (RICHTER, 2016). O desmame não é, portanto, simplesmente um evento, mas um processo gradual que, além disso, está sujeito a inúmeras influências ambientais e sociais (RICHTER, 2016).

Durante os meses ou anos em que uma criança é desmamada do leite materno, vários alimentos são introduzidos na dieta do bebê e, eventualmente, o leite materno é completamente removido como fonte alimentar. Bebês em desenvolvimento têm demandas energéticas significativas e alimentos complementares devem ser introduzidos para fornecer ingestão calórica suficiente (MILLER, 2020). A introdução desses alimentos sólidos deve englobar uma ampla variedade de alimentos, sabores e texturas na dieta à base de líquidos de um bebê, pois esse momento crucial tem um impacto importante nas preferências alimentares futuras e no estado de saúde em longo prazo (EVANS, 2019).

Alguns estudos consideram como desmame precoce em humanos, o que ocorre antes das 17 semanas de idade e tardio o que ocorre após 26 semanas de idade (EVANS, 2019). Porém, até onde se sabe, não houve suficientes estudos prospectivos para avaliar esses processos no contexto de uma coorte grande e saudável de mães e seus bebês, matriculados no início da gravidez e vivendo em uma variedade de sociedades modernas, sob influências ambientais relativamente estáveis (VILLAR, et al., 2020).

De modo geral, há menos início da amamentação e menor duração do AME por mães com baixo nível de escolaridade em comparação com aquelas de alto nível (BRASIL, 2009). O desmame precoce tem sido associado à presença de aumento de peso e obesidade em crianças (SIGULEM, et al., 2001). Essas descobertas podem ajudar os governos a investigar por que essas disparidades existem. As políticas nacionais comuns aos países onde se

observam as maiores taxas de aleitamento são as regulamentações de licença maternidade remunerada, que vão além do mínimo estipulado pela legislação. Além disso, foi observado que esses países não estavam tão expostos a altos níveis de *marketing* por parte das empresas que vendem substitutos do leite materno (SARKI; PARLESAK; ROBERTSON, 2019).

Dada a importância do aleitamento materno e as consequências do desmame precoce sobre parâmetros morfológicos e comportamentais permanentes, estudos sobre os mecanismos que determinam essas adaptações são necessários e, nesse contexto, o desmame precoce apresenta um modelo experimental em animais revisado a seguir.

#### **2.4. Desmame precoce em animais**

Durante os primeiros 10 dias do período neonatal, em ratos, a mãe realiza comportamentos intensivos como amamentar, catar e lamber (*grooming and licking*) os filhotes. No processo normal de desenvolvimento dos ratos, os filhotes são capazes de comer, manter a temperatura corporal e evacuar por conta própria a partir dos 13 dias de idade e os filhotes desmamados podem sobreviver sozinhos a partir dos 15 dias de vida. Após o desmame, a prole deve se tornar independente de sua mãe tanto com relação à alimentação quanto aos outros comportamentos necessários à sobrevivência. Normalmente, os ratos são desmamados com 3 ou 4 semanas de idade. O comportamento materno intenso é observado durante as primeiras 3 semanas após o parto em ratos de laboratório e selvagens. Em camundongos, as mães ainda exibem uma quantidade considerável de comportamento maternal em relação aos filhotes mesmo durante o período pré-desmame, ou seja, entre os dias 14-21 pós-parto. Isso apoia o postulado de que as interações sociais entre uma mãe e seus filhotes durante o período de lactação são um fator importante responsável pelas mudanças neurais que ocorrem em animais desmamados precocemente (ITO, et al., 2006).

Durante o período de desmame, além da estimulação tátil, feromônios presentes nas fezes da mãe influenciam o desenvolvimento do sistema nervoso do filhote, pois contêm ácido biliar. Foi observado que os filhotes incapazes de consumir as fezes de suas mães durante o período pós-natal entre os dias 12 e 28, tiveram um nível reduzido de proteína de mielina em seu

sistema nervoso central. Portanto, mudanças comportamentais e autonômicas em filhotes desmamados precocemente podem estar relacionadas a uma mielinização retardada no sistema nervoso central causada pela ausência de fezes da mãe. Em relação a esse achado, foi relatado que o estado de mielinização no sistema nervoso central pode afetar comportamentos relacionados à ansiedade (ITO, et al., 2006).

## 2.5. Ansiedade

A ansiedade é considerada um traço poligênico multifatorial, em que o *continuum* da ansiedade fisiológica até a psicopatologia é provavelmente moldado pela plasticidade orientada pelo ambiente no nível genômico (SAH, et al., 2019). A ansiedade pode ser operacionalizada como uma resposta emocional a ameaças potenciais vagas, isso difere, por exemplo, do medo que é evocado por estímulos agudamente ameaçadores. A ansiedade é caracterizada por estimulação, vigilância e apreensão que resulta em padrões específicos de comportamentos defensivos (aversão) e respostas autonômicas (respiração e frequência cardíaca aumentadas) ocorrendo de forma simultânea, dependendo da natureza da ameaça e do contexto (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

Portanto, a ansiedade pode ser definida como um estado de humor orientado para o futuro, ativado por ameaça distal e potencial, e está associado à excitação e vigilância (DAVIS, 2010). Estudos têm tentado elucidar os mecanismos de circuito subjacentes aos estados de ansiedade. Algumas regiões foram apontadas por desempenhar papéis importantes na ansiedade, como a amígdala basolateral (BLA) e o núcleo do leito anterodorsal da estria terminal (adBNST), que medeiam os efeitos comportamentais ansiogênicos e ansiolíticos, indicando a presença de circuitos neuroniais distintos na ansiedade, cujas funções são determinadas por suas conexões. Por exemplo, a ativação da via do BLA para o hipocampo ventral (vHC) é ansiogênica, enquanto que a ativação da projeção do BLA para a amígdala central (CEA) é ansiolítica. Por outro lado, duas vias paralelas do BNST ventral (vBNST) para a Área Tegmentar Ventral (VTA) medeiam os resultados comportamentais ansiogênicos ou ansiolíticos (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

O sistema serotoninérgico também está associado ao comportamento similar à ansiedade. Em particular, a disfunção da enzima triptofano hidroxilase (TPH), do transportador de serotonina (SERT) ou do receptor 5-HT1A pode induzir comportamentos em roedores que estão associados à ansiedade e depressão (O'LERAY; CONDAGNONE; CRYAN, 2020). Entretanto esses mecanismos não se associam de forma simples. Os primeiros modelos animais de ansiedade foram desenvolvidos antes da elaboração das classificações de transtornos psiquiátricos do DSM e visavam modelar a ansiedade em geral (GRAEFF, 2008). As classificações de transtornos de ansiedade foram elaboradas com base em grupos de sintomas, curso de tempo e resposta terapêutica, enquanto na pesquisa básica, a introdução de novos agentes com ação serotoninérgica no estudo da ansiedade resultou em resultados inconsistentes (GRAEFF, 2008). A proposta de que cada classe de transtorno de ansiedade envolve um determinado conjunto de sistemas neurobiológicos levou à conclusão de que os modelos animais deveriam abordar de forma mais especializada as classes do transtorno de ansiedade. Neste sentido, o modelo experimental do labirinto em cruz elevado foi considerado um modelo misto, de modo que o rato exibe diferentes estratégias de defesa, que poderia ser influenciado em direções opostas pela 5-Hidroxitriptamina (5-HT), também denominada de serotonina (Handley et al., 1993). Pelo menos, duas estratégias podem ser facilmente observadas: (1) evitar braços abertos quando o rato está em um dos braços fechados (esquiva inibitória), e (2) escapar de um braço aberto para entrar em um braço fechado mais seguro (fuga unilateral) (GRAEFF, 2008).

Além disso, as drogas de ação sistêmica podem ter efeitos complexos. Especificamente, os inibidores da recaptação de serotonina (SSRIs) causariam a resposta ansiogênica inicial relatada por alguns pacientes, aumentando agudamente a neurotransmissão viareceptor 5-HT2C (GRAEFF, 2008). Com o tratamento repetido, a regulação negativa desses receptores em áreas límbicas, como a amígdala, juntamente com o aumento da neurotransmissão pós-sináptica mediada pelo 5-HT1A, diminuiria a ansiedade (GRAEFF, 2008). No entanto, a questão sobre quais áreas e receptores estão envolvidos nos distintos transtornos de ansiedade que respondem a essa classe de drogas permanece (GRAEFF, 2008).

Diversos fatores podem estar associados ao comportamento similar à ansiedade em animais. Dentre eles, o estresse considerado tóxico envolve a incorporação biológica de seus efeitos, com consequências permanentes ao longo da vida e, portanto, pode ser entendido como uma forma de adaptação neuroplástica (MCEWEN, et al., 2015). Está fortemente associado a transtornos de saúde mental, incluindo ansiedade (MCEWEN, et al., 2015). Além disso, a ansiedade, bem como outros distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo a depressão tem sido associada à obesidade (OGRODNIK, et al., 2019) e ao desmame precoce (KIKUSUI, et al., 2019).

O desmame precoce é considerado um estresse, que envolve a interrupção abrupta dos cuidados maternos e da nutrição adequada, uma vez que a prole é precocemente separada da mãe antes da idade adequada do desmame (TAVARES, et al., 2020). O desmame precoce também é considerado um modelo de estresse neonatal porque aumenta a resposta autonômica aos estressores na idade adulta (ITO, et al., 2006). Nesse sentido, o estresse do desmame precoce ocorrendo no período crítico da vida, pode programar o futuro estado neurológico e comportamental desse animal (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011), tornando-o mais suscetível ao comportamento similar à ansiedade na vida adulta através de adaptação neuroplástica (MCEWEN, et al., 2015) e evidenciado em pesquisas usando o teste de labirinto com esses animais (KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004; KANARI, et al., 2005; ITO, et al., 2006; KIKUSUI, et al., 2019).

## **2.6. Ansiedade e comportamento alimentar**

Dados epidemiológicos sugerem que o índice de massa corporal (IMC) e a obesidade são fortes fatores de risco para depressão e ansiedade. Entretanto, ainda não está claro qual seria a causa e qual seria o efeito, pois a predisposição à obesidade pode aumentar a suscetibilidade à ansiedade e a correlação inversa também é verdadeira (ALONSO-CARABALLO, et al., 2019). Achados mostram que o consumo da dieta palatável, ou seja, dietas com alto teor de gordura e açúcar levam a um fenótipo obeso e parecem induzir comportamento semelhante ao de ansiedade em ratos (SOUZA, et al., 2007). Outro estudo sugeriu que o consumo de dieta palatável poderia gerar dependências similares ao uso de drogas, por ativar mecanismos que liberam

opioides cerebrais e dopamina no sistema límbico, e a interrupção dessa alimentação poderia gerar um quadro de abstinência onde a ansiedade seria um dos comportamentos observados nessa circunstância (COLANTUONI, et al., 2002). Em suma, estudos com animais mostram que o consumo de determinados alimentos, como os altamente-palatáveis (SOUZA, et al., 2007) e o estado nutricional, como a obesidade (ALONSO-CARABALLO, 2019) podem influenciar diretamente no estado de ansiedade.

Em humanos, os resultados caminham na direção oposta. Estudos retrospectivos indicam que o início de transtornos de ansiedade tende a preceder o desenvolvimento de transtornos alimentares (MCLEAN, et al., 2007). Um estudo que avaliou a correlação desses fatores em mulheres sugere que a relação entre ansiedade social e alimentação desordenada é totalmente mediada pela supressão expressiva, ou seja, a emoção negativa não expressa é deslocada para o corpo, promovendo assim sintomas de alimentação desordenada (MCLEAN, et al., 2007) e, portanto, o uso habitual da supressão expressiva como uma estratégia de regulação da emoção, que pode promover quadros como sobrepeso e obesidade. Nessa mesma direção, outra autora discute que a tristeza parece favorecer a ingestão de alimentos ricos em gordura / doces e gratificantes ao paladar, enquanto a ingestão durante um estado de felicidade favorece a ingestão de frutas secas (DALLMAN, 2010). Essa mesma autora também sugere que, tanto em pessoas quanto em animais, ocorre uma mudança na escolha de alimentos palatáveis com o estresse, mas especificamente o hormônio do estresse parece aumentar o desejo ou a motivação (DALLMAN, 2010).

Estudos experimentais têm sido realizados na tentativa de elucidar a correlação desses fatores. Em alguns casos, animais propensos ou resistentes à obesidade são avaliados quanto à ansiedade (ALONSO-CARABALLO, et al., 2019). Por outro lado, pode-se observar essa correlação em estudos com outros modelos, que não seja a obesidade. Animais submetidos a situações estressoras no início da vida apresentam alterações tanto no comportamento semelhante à ansiedade quanto no comportamento alimentar, sugerindo que estes comportamentos podem estar relacionados por possuírem mecanismos similares de controle, os quais são susceptíveis a alterações por insultos no

início da vida (DE SOUZA, et al., 2018; DE SOUZA, et al., 2020; TAVARES, et al., 2020).

## 2.7. Comportamento alimentar homeostático

O comportamento alimentar é um processo complexo. Ele incorpora necessidade homeostática, prazer hedônico e processos cognitivos superiores, como informações contextuais e aprendidas (SASAKI, 2017). Essa regulação ocorre em curto prazo, com o *feedback* do trato gastrointestinal, que fornece informações ao SNC acerca do volume do alimento, e em longo prazo pelo tecido adiposo, que informa o SNC sobre o estoque energético. Além disso, o comportamento alimentar ainda é modulado por informações ambientais (ANDERMANN; LOWELL, 2017).

No SNC, o controle do comportamento alimentar envolve diversas estruturas, as quais podem ser ativadas por uma ampla gama de influências, antes mesmo do alimento ser consumido, como as informações de cheiro e sabor. Uma vez no trato gastrointestinal, os efeitos e consequências do consumo do alimento são mediados por duas vias, a neural e a humoral (SASAKI; MATSUI; KITAMURA, 2016). A via neural é mediada pelas aferências vagais que inervam o trato gastrointestinal (TGI) e pela veia porta hepática, que são estimuladas por nutrientes, hormônios e, mecanicamente, pela presença de alimento no trato. A via humoral, por sua vez, é mediada por nutrientes, como glicose, aminoácidos e ácidos graxos, e hormônios, como leptina, insulina e grelina (SASAKI, 2017).

Resumidamente, vários peptídeos são derivados do trato gastrointestinal, nomeadamente colecistocinina (CCK), peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), peptídeo tirosina tirosina (PYY) e a grelina, sendo apenas este conhecido por estimular a ingestão de alimentos, enquanto que aqueles a inibem. Esses peptídeos podem cruzar a barreira hematoencefálica com direção ao núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo ou, via nervo vago, atingem o núcleo do trato solitário (NTS) do tronco cerebral (PRINZ; STENGEL, 2017).

Quando os sinais anorexigênicos alcançam o ARC, eles ativam neurônios contendo a pró-piomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (CART) e inibem neurônios contendo o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao Agouti (AgRP). POMC / CART levam a

uma ativação dos receptores de melanocortina 3 e 4 no núcleo paraventricular (PVN) e na área hipotalâmica lateral (LHA), o que causa uma redução da ingestão de alimentos. O receptor de melanocortina 4 também é expresso no NTS, o qual também contém Neurônios POMC. Em contraste, a grelina, como um peptídeo orexigênico, ativa neurônios contendo NPY / AgRP e inibe neurônios contendo POMC / CART no ARC. NPY estimula a ingestão de alimentos ativando o receptor Y1 no PVN, enquanto AgRP aumenta a ingestão de alimentos como um antagonista dos receptores de melanocortina 3 e 4. Ademais, o NPY também pode atuar no NTS para estimular a ingestão de alimentos (PRINZ; STENGEL,2017).

Além disso, o sistema serotoninérgico tem sido extensivamente relacionado ao controle do comportamento alimentar (FINK, 2015). A serotonina é produzida no tronco encefálico e age, principalmente, no hipotálamo para regulação do apetite (LEE; CLIFTON, 2020). Os efeitos fisiológicos da serotonina são modulados por uma variedade de proteínas que regulam sua síntese, armazenamento, liberação, absorção, degradação e é mediada por, pelo menos, 14 receptores distintos, dentre eles, sete famílias diferentes já foram identificadas, a saber: A família 5HT1 (5HT1A, 5HT1B, 5HT1D, 5HT1E e 5HT1F.O 5HT1C foi renomeado como 5HT2C), família 5HT2 (5HT2A, 5HT2B e 5HT2C), família 5HT3 (5HT3A, 5HT3B, 5HT3C, 5HT3D, 5HT3E), receptor 5HT4, família 5HT5 (5HT5A, 5HT5B, 5HT5C), receptor 5HT6 and receptor 5HT7 (LAM et al. 2010).

Na regulação do comportamento alimentar, podem-se destacar as ações dos receptores 5HT1B e 5HT2C no hipotálamo. O receptor 5HT1B está presente em neurônios que expressam os neuropeptídeos orexígenos NPY/AgRP. Quando a serotonina se liga a esse receptor, há a hiperpolarização do neurônio e a consequente inibição da liberação dos peptídeos orexígenos. Além disso, o receptor 5HT1B também está expresso em neurônios produtores do neurotransmissor inibitório GABA (Ácido Gama-amino-butírico). Os neurônios GABAérgicos inibem os neurônios produtores de POMC/CART. A hiperpolarização causada pela ligação da serotonina também inibe a liberação de GABA e, consequentemente, os neurônios POMC/CART deixam de ser inibidos por ela. Ademais, os neurônios POMC/CART expressam outro receptor serotoninérgico, o 5HT2C. Ao contrário do 5HT1B, esse receptor despolariza à

ligação da serotonina. Com isso, são liberados seus neuropeptídeos anorexigênicos. Tomados em conjunto, esses dados demonstram que a ação anorexigênica da serotonina se dá, principalmente, pela sua ação nos receptores 5HT1B e 5HT2C no hipotálamo. Além disso, pelo receptor 5-HT1B, a serotonina contribui para saciedade e incentivando a termogênese e, por isso, tem sido alvo de metas fármaco-terapêuticas para o tratamento da obesidade (HEISLER et al., 2006; DE MATOS FEIJÓ; BERTOLUCI; REIS, 2011).

Em animais desmamados precocemente, foram observadas algumas alterações nesse sistema, como a diminuição da ação da fenfluramina na inibição da ingestão alimentar e aumento da expressão de NPY e SERT mRNA no hipotálamo e 5HT2C no tronco encefálico em ratos machos jovens (TAVARES, et al., 2020). Em machos adultos que foram desmamados precocemente, foi observado aumento da expressão de mRNA de SERT e diminuição do 5HT1B no hipotálamo, bem como um aumento da expressão de 5HT1B, SERT e 5HT2C no tronco cerebral (TAVARES, et al., 2020). Enquanto que em fêmeas jovens desmamadas precocemente observou-se uma diminuição da expressão de mRNA de 5HT-1b, 5HT-2c e SERT no hipotálamo, e aumento no tronco cerebral (TAVARES, et al., 2020).

Uma das formas de manipular o sistema serotoninérgico é através da utilização de drogas antidepressivas. A fluoxetina é um inibidor da recaptação de serotonina pelo seu transportador (SERT) na membrana pré-sináptica. Consequentemente, sua ação leva ao aumento da atividade serotoninérgica cerebral. Em vertebrados, há uma relação inversa entre os níveis de serotonina e a ingestão alimentar. Assim, ao aumentar os níveis de serotonina, a fluoxetina atua inibindo a ingestão alimentar (WONG, et al., 1995). Esse fármaco é indicado para o tratamento do transtorno depressivo maior e outros distúrbios psiquiátricos, como a bulimia nervosa (BURT, et al., 2007). Também tem sido utilizada como tratamento em curto prazo para a perda de peso, pois tem se mostrado efetivo e relativamente seguro para esse fim. Estudo com 201 pessoas com IMC entre 25-42 Kg/m<sup>2</sup>, num período de 4 ou 8 semanas, demonstrou que houve perda de peso de 3,24 Kg e 6,67Kg, respectivamente, sem ganho de peso após descontinuação do uso da droga (M AFKHAMI-ARDEKANI AND H SEDGHI, 2005). Em animais, a fluoxetina também

apresenta ação anorética, além de adiantar o disparo da saciedade (RODGERS, et al., 2010). Portanto, essa droga se mostra como uma boa forma de manipular o sistema serotoninérgico para fins de estudos relacionados ao comportamento alimentar.

Todos os mecanismos citados até agora controlam, principalmente, a alimentação em resposta ao *déficit* geral de energia ou outros tipos de necessidade metabólica e podem ser classificados como o controle homeostático do comportamento alimentar, que possui o objetivo de assegurar o balanço energético, ou seja, um equilíbrio do gasto e do consumo energético (LIU; KANOSKI, 2018).

## 2.8. Comportamento alimentar hedônico

Existe, também, outro tipo de controle do comportamento alimentar, denominado de controle hedônico. Dele, participam outras variáveis como o aprendizado, a memória e os processos cognitivos que podem afetar a alimentação com base em experiências anteriores aprendidas e aspectos dos alimentos incluindo o desejo apetitivo (motivação, incentivo de saliência ou “querer”) e o gozo consumatório (prazer, valor de recompensa ou “gostar”) (MORALES; BERRIDGE, 2020). Simplificadamente, alguns desses conceitos podem ser atribuídos a sistemas biológicos específicos como, por exemplo, a motivação, associada ao sistema dopaminérgico, o valor hedônico, que é regulado pelo sistema opioidérgico e a aprendizagem, mais associada a uma área do que a um neurotransmissor, sendo essa área o hipocampo (SASAKI, 2017).

Mais especificamente, a aferência dopaminérgica para o Núcleo Accumbens (NAcc) a partir da Área Tegmentar Ventral (VTA), está envolvida na codificação das propriedades recompensadoras dos alimentos. Além disso, o consumo de alimentos palatáveis pode causar um aumento nos níveis de dopamina extracelular (DA) no NAcc. Estudos *in vivo* indicam que a liberação de DA aumenta significativamente no NAcc durante o consumo de uma refeição palatável, e a privação de alimentos por 20 horas amplifica a magnitude desse aumento. Além disso, tanto a DA quanto a sinalização opioidérgica no NAcc amplificam a reatividade, aumentando o incentivo ou

“desejo” e influenciando na percepção hedônica de uma recompensa alimentar (LIU; KANOSKI, 2018).

O hipocampo, por sua vez, é quem integra informações acerca do ambiente visuoespacial externo, o contexto interno (estado de energia) e experiência anterior aprendida e pode modular potenteamente o comportamento alimentar. Estudos demonstram que pacientes amnésicos irão consumir a segunda e a terceira refeições apenas alguns minutos após a primeira, enquanto em pacientes não amnésicos, as memórias relacionadas a uma refeição recente são um fator poderoso no que diz respeito à tomada de decisões sobre a ingestão alimentar subsequente (por exemplo, quando comer) e a quantidade consumida. Além desses, estudos demostraram que as pessoas que assistiam a televisão enquanto almoçavam eram mais propensas a comer mais biscoitos mais tarde em comparação com indivíduos que não eram distraídos enquanto almoçavam. Esses achados demonstram que o apetite e o consumo são influenciados por memórias episódicas relacionadas à refeição, dependentes do hipocampo, que estão sujeitas à percepção visual e sensorial de um indivíduo durante a ocasião da refeição (LIU; KANOSKI, 2018).

Imediatamente antes, durante e após a alimentação, experiências sensoriais da ingestão (sabor), sinais interoceptivos (fome, saciedade e outros estados metabólicos) e sinais externos (localização espacial) formam associações que são aprendidas e influenciam comportamentos futuros em relação à aquisição e consumo de alimentos (LIU; KANOSKI, 2018). Portanto, pode-se afirmar que esses comportamentos recebem influências do ambiente obesogênico moderno, que emite sinais alimentares condicionados, associados ao consumo de alimentos altamente palatáveis e caloricamente densos, os quais, por sua vez, podem vir a acarretar em ingestão desses alimentos, mesmo na ausência de *déficits* energéticos ou metabólicos (LIU; KANOSKI, 2018).

Hipóteses apontam para a participação do sistema serotoninérgico atuando também nesse componente do comportamento alimentar, no sentido em que os neurônios serotoninérgicos são ativos durante as fases de antecipação e consumação das respostas de recompensa (LI, et al., 2016). Entretanto, mais estudos são necessários para demonstrar se a transmissão

serotonérgica desempenha um papel crítico nesses efeitos (LEE; CLIFTON, 2020).

O comportamento hedônico supera o homeostático no sentido de que os alimentos palatáveis possuem o poder de evocar comportamentos apetitivos e alimentares apesar dos sinais internos de saciedade para inibir essas respostas (SAMPLE, et al., 2016). No entanto, as vias neurais homeostáticas e não homeostáticas que regulam o comportamento alimentar não são facilmente dissociáveis (LIU; KANOSKI, 2018). O estudo dessa complexa regulação é de extrema importância para entender distúrbios do balanço energético que geram anorexia e obesidade, sendo este um grande problema de saúde pública emergente nos últimos anos (SCHWARTZ, et al., 2017). Estudos de neuroimagem de indivíduos obesos ou comedores compulsivos demonstraram ativação cerebral do tipo sensibilização para sinais alimentares, que é notavelmente semelhante à ativação cerebral de pessoas que sofrem de dependência de drogas (MORALES; BERRIDGE, 2020).

## **2.9. Desmame precoce e comportamento alimentar**

Estudos experimentais com estresse perinatal estão associados a anormalidades comportamentais, como resposta ao estresse elevada e prolongada (DE SOUZA, et al., 2020), aprendizagem e memória prejudicadas, déficits de atenção, alterações do comportamento exploratório, do comportamento social e lúdico, preferência aumentada por álcool (WEINSTOCK, 2008) e alterações no comportamento alimentar (DE SOUZA, et al., 2018).

Outro modelo de estudo com animais, que também envolve um agente estressor, é o desmame precoce, no qual os filhotes são separados das mães antes da idade adequada do desmame (SHIMOZURU et al., 2007). Esse modelo tem se mostrado relevante devido aos impactos que pode acarretar, pois estudos mostram que a ruptura do binômio mãe-filhote, quando realizada de forma precoce, leva ao aumento da secreção de corticosterona, maior ansiedade e respostas elevadas ao estresse na idade adulta (KIKUSUI, et al., 2019). Ademais, há diminuição da quantidade de comportamento materno exibido pelas fêmeas, sendo este um fator crítico, por causa de sua transmissão não genômica para as gerações subsequentes (KIKUSUI; MORI,

2009). Em outras palavras, os cuidados maternos podem acarretar mudanças epigenéticas na prole, que serão transmitidas a outras gerações. Outro efeito é a indução de modificações nas células secretoras na mucosa gástrica do animal que persistem até a idade adulta, podendo alterar o microambiente para a indução de doenças gástricas (ZULIAN, et al., 2017; TELES SILVA, et al., 2020).

Estudos mais recentes mostraram que o desmame precoce também pode alterar os padrões de comportamento alimentar do animal levando a um aumento da ingestão de alimentos e, consequentemente, ao aumento do peso corporal (TAVARES, et al., 2020; SOARES et al., 2021). Também foi demonstrado aumento do consumo de alimento palatável, preferência por esse tipo de alimento e maior consumo de alimento palatável após estresse leve, como uma maneira de lidar com o estresse (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011; OLIVEIRA, et al., 2021). Esses animais também apresentam uma preferência alimentar à gordura e açúcar apenas em animais machos (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011; SOARES et al., 2021).

Além disso, foi observado um menor tempo de reatividade à sacarose, teste utilizado para avaliar o “gostar” (GRILL; NORRGREN, 1978) e maior ingestão de alimentos palatáveis, revertido com droga opioidérgica (DO AMARAL ALMEIDA, et al., 2021), o que sugere uma diminuição da percepção do prazer que resulta em uma compensação com o aumento do consumo do alimento para atingir os padrões de recompensa alimentar (BELLISLE, 2012) e também reforça a hipótese do envolvimento do sistema opioidérgico na regulação do gostar (*Liking*)(SASAKI, 2017). Esses animais também apresentaram uma alteração no ritmo de alimentação, com aumento da ingestão alimentar na fase clara e diminuição da ingestão alimentar na fase escura (TAVARES, et al., 2020).

Assim, o presente estudo se propôs a investigar a relação entre o desmame precoce e os comportamentos similar à ansiedade e alimentar e a participação do sistema serotoninérgico nessa relação.

### **3. HIPÓTESE**

O desmame precoce aumenta os níveis de ansiedade, diminui o comportamento alimentar homeostático e aumenta o hedônico em fêmeas, via alterações na neurotransmissão serotoninérgica.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Geral

Investigar os efeitos do desmame precoce sobre os níveis de ansiedade e sobre o comportamento alimentar homeostático e hedônico de ratas fêmeas adultas submetidas ou não à administração de fluoxetina.

### 4.2. Específicos

Em ratas fêmeas adultas desmamadas ou não precocemente, submetidas ou não à administração de fluoxetina, avaliar:

- A evolução ponderal;
- A ansiedade experimental;
- A Sequência Comportamental de Saciedade com dieta padrão;
- A Sequência Comportamental de Saciedade com dieta palatável.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As fêmeas, com peso entre 250g e 300g, após adaptação, foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. Após um período de cinco dias com o macho, as fêmeas foram acomodadas em gaiolas individuais e a confirmação da prenhez foi realizada pelo acompanhamento do peso corporal. As ratas tiveram livre acesso à água e dieta padrão. O dia de nascimento dos filhotes foi considerado o dia 0, e no 1º dia de vida foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes machos e fêmeas. Apesar do estudo utilizar apenas ratas fêmeas, neste trabalho, optou-se por manter os machos na ninhada para evitar um provável efeito da alteração do cuidado materno (MOORE; MORELLI, 1979). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos 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 com os animais 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 (nº0078/2020).

### 5.2. Desmame precoce e formação dos grupos experimentais

Os grupos experimentais foram formados de acordo com o período do desmame de cada ninhada, ou seja, para obtenção dos grupos, os filhotes de diferentes ninhadas foram desmamados em períodos distintos. O desmame precoce em ratos é considerado quando há interrupção do aleitamento por volta do 15º dia de vida, e o natural, aos 30 dias de vida (KIKUSUI; MORI, 2009; NOVÁKOVÁ et al., 1962). Assim, as ninhadas pertencentes ao grupo D15 foram desmamadas no 15º dia pós-natal e o grupo D30 foi desmamado no 30º dia pós-natal (desmame natural). As nutrizes dos animais D15 foram separadas de seus filhotes e esses animais receberam dieta comercial de biotério triturada e acondicionada em recipiente no piso da gaiola até o dia 30 de vida. As nutrizes dos animais D30 foram separadas de seus filhotes no dia

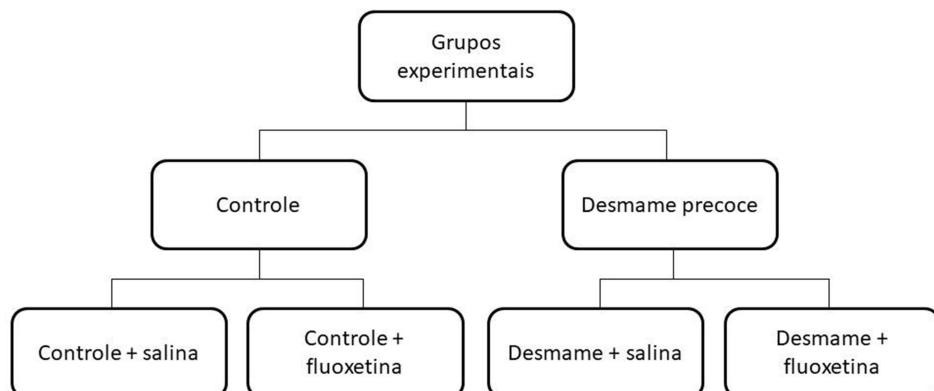
30 pós-natal. Até esse dia, os animais eram amamentados e podiam ter acesso à dieta padrão disponível na gaiola. Após o dia 30, todos os grupos foram submetidos, exclusivamente, à dieta comercial de biotério em sua forma normal (não triturada) e apenas fêmeas foram utilizadas neste estudo. Estas foram mantidas em número de 2 por gaiola até a realização dos experimentos, quando foram separadas em gaiolas individuais três dias antes do início dos testes.

### **5.3. Grupos experimentais**

Os grupos experimentais foram formados por 16 animais divididos de acordo com o dia do desmame, 15º ou 30º dia pós-natal, e a manipulação farmacológica, salina ou fluoxetina.

- 1) Segundo o período do desmame:
  - Grupo Controle – desmamado no período natural para a espécie, 30º dia pós-natal (N=8);
  - Grupo desmamado precocemente – animais desmamados no 15º dia pós-natal (N=8).
- 2) Segundo a manipulação farmacológica:
  - Grupo controle salina (D30 Salina) (N=8);
  - Grupo controle fluoxetina (D30 Fluoxetina) (N=8);
  - Grupo desmame precoce salina (D15 Salina) (N=8);
  - Grupo desmame precoce fluoxetina (D15 Fluoxetina) (N=8).

Abaixo, segue um esquema demonstrando a divisão dos grupos experimentais.



**FIGURA 1.** Esquema de grupos experimentais do estudo. Estes foram formados segundo o dia do desmame e a manipulação farmacológica.

#### **5.4. Peso corporal**

O peso corporal (em gramas) foi mensurado em animais com idades entre 194 e 197 dias de vida. Foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima de 500g (menor divisão 0,001g) (São Paulo, Brasil).

#### **5.5. Labirinto em cruz elevado**

O teste para avaliação da ansiedade foi realizado nos animais com idades entre 194 e 197 dias de vida, durante 5 minutos. Foi utilizado o modelo do labirinto em cruz elevado. Esse labirinto, proposto por Handley e Mithani (HANDLEY; MITHANI, 1984), é constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x10x 40 cm), que se estendem a partir de uma plataforma central comum (10x10cm), elevados a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso. O revestimento do piso e das paredes dos braços e região central do labirinto é de material antiderrapante e escuro. Durante o teste, o labirinto foi iluminado com luz vermelha de baixa voltagem (15 W). Este modelo experimental é baseado no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados. A realização do teste consistiu em colocar os animais, individualmente, no espaço central do aparelho, com a cabeça voltada para o braço aberto, e registrar os dados durante 5 minutos. Apenas um avaliador observou as sessões e registrou em protocolo o tempo de permanência e o número de entradas em cada braço. O registro de cada entrada teve validade a partir do momento em que o animal encontrou-se com as 4 patas em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado através de um cronômetro digital. O tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos e fechados foi utilizado como índice de ansiedade. Trinta minutos antes do experimento foi administrada solução salina (NaCl 0,9%) ou fluoxetina (10 mg/Kg de peso corporal), via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após o estudo com salina, foi realizado o estudo com a fluoxetina. Todas as análises foram realizadas entre as 12 e 15h, no ciclo escuro. Os mesmos animais foram utilizados para avaliação com salina e

fluoxetina, com intervalo de tempo seguro respeitando o tempo de meia-vida da droga (GURY; COUSIN, 1999).

### **5.6. Sequência Comportamental de Saciedade (SCS)**

A SCS foi analisada em fêmeas por volta dos 200 dias de vida. A análise da SCS foi descrita por (HALFORD et al., 1998). Os animais foram mantidos em privação alimentar prévia de quatro horas antes da oferta de alimento (8 às 12 horas, na fase escura do ciclo). Após o período de privação alimentar de quatro horas, os animais receberam quantidade conhecida (30 gramas) de dieta padrão de biotério (Presence®) ou de um cookie de chocolate da marca Bauducco, que ocorreu 24h após o teste com a dieta padrão. Trinta minutos antes da oferta de cada alimento foi administrada fluoxetina (10 mg/Kg de peso corporal, via intraperitoneal) para ambos os grupos experimentais. Uma semana depois, o mesmo procedimento foi realizado com solução salina (NaCl 0,9%), via intraperitoneal. Os experimentos foram sempre realizados entre as 12 e 15h, durante o ciclo escuro. A SCS foi registrada em protocolo padronizado, por avaliador treinado, durante uma hora. Foram registradas as durações, em segundos, dos seguintes comportamentos: a) Alimentação: Registro iniciado quando o rato foi observado ingerindo a ração no comedouro. O mesmo foi finalizado no momento em que o rato abandonou o comedouro, b) Limpeza: O animal procedeu inicialmente o lamber de patas anteriores e movimentos dessas sobre a cabeça, continuando-se com o lamber da região ventral, do dorso e das patas posteriores, c) Repouso: O rato foi observado em posição de descanso, apresentando o corpo repousado sobre o assoalho da gaiola. Outras medidas registradas: consumo alimentar (diferença do peso (g) de ração oferecida e rejeitada durante o período de uma hora do registro da SCS), a duração da refeição (minutos), a taxa de alimentação (Kcal/min), o tamanho da refeição (Kcal consumida /Kg de peso corporal) e latência para iniciar a alimentação (segundos). Os mesmos animais foram utilizados para avaliação com salina e fluoxetina, com intervalo de tempo seguro respeitando o tempo de meia-vida da droga (GURY; COUSIN, 1999). Bem como receberam a oferta tanto de dieta padrão de biotério (Presence®), quanto de cookies Bauducco em momentos diferentes.

### **5.7. Aspectos éticos**

Os procedimentos experimentais com os animais foram de acordo com os “Princípios éticos na experimentação animal”, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de experimentação animal (CONCEA), obedecendo às normas de manuseio e cuidado com os animais. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, sob número de processo 0078/2020.

### **5.8. Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  Erro padrão da média (SEM). Para comparações simples, foi utilizado o teste t. Para comparações múltiplas, foi utilizada ANOVA Two Way, seguida do pós-teste de Bonferroni, sempre adotando níveis de significância como  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. PESO CORPORAL

O desmame precoce não alterou o peso corporal quando comparado ao grupo controle (C:  $241,87 \pm 20,98$  vs D:  $252,87 \pm 19,2$ , n=8, p>0,05).

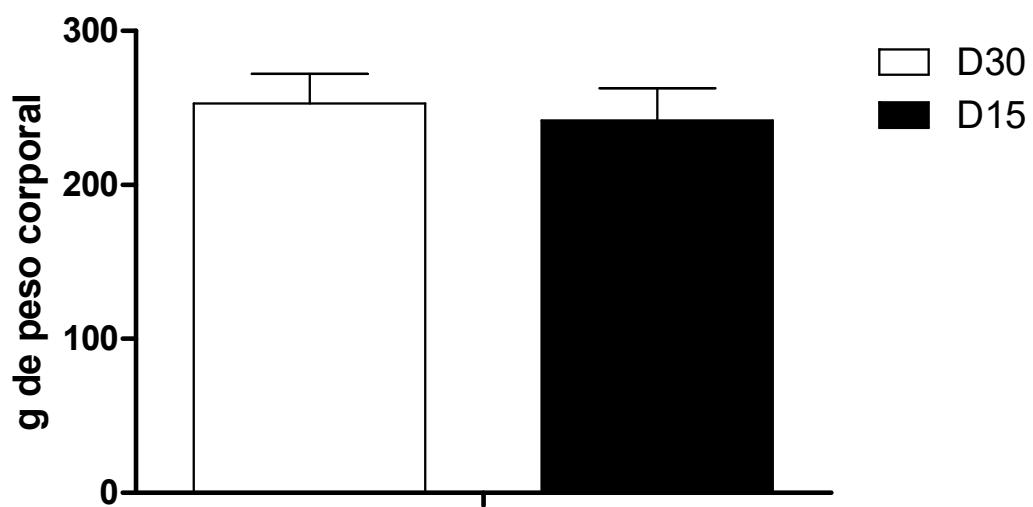


Figura 2. Efeitos do desmame precoce no peso corporal de ratas adultas fêmeas (N=8). O peso foi mensurado em balança eletrônica digital em animais com idades entre 194 e 197 dias de vida. Teste t. Dados expressos em Média ± Erro padrão da média. N=6.

### 6.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O desmame precoce não alterou o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado quando comparado ao grupo controle (D30 Salina:  $66,14 \pm 18,92$ , n=7 vs D15 Salina:  $83,25 \pm 24,62$ , n=8, p>0,05) (Figura 3). Mesmo após a administração de fluoxetina, não houve diferença no tempo de permanência nos braços abertos entre o grupo controle e desmame precoce (D30 Fluox:  $5,43 \pm 3,04$ , n=7 vs D15 Fluox:  $11,12 \pm 9,12$ , n=8, p>0,05) (Figura 3). Com relação aos braços fechados, o mesmo resultado foi observado. Não houve diferença significativa entre o tempo de permanência entre o grupo controle e desmame precoce nas análises sem fluoxetina (D30 Salina:  $208,71 \pm 24,44$ , n=7 vs D15 Salina:  $185,37 \pm 31,14$ , n=8, p>0,05)

(Figura 3) ou com administração prévia de fluoxetina (D30 Fluox:  $284,14 \pm 5,56$ , n=7 vs D15 Fluox:  $271,125 \pm 17,0$ , n=8, p>0,05) (Figura 3).

A administração prévia de fluoxetina aumentou o tempo de permanência nos braços fechados do labirinto em cruz elevado quando comparado ao grupo salina nos animais controle (D30 Salina:  $208,71 \pm 24,44$  vs D30 Fluox:  $284,14 \pm 5,56$ , n=7, p<0,01) e desmame precoce (D15 Salina:  $185,37 \pm 31,14$  vs D15 Fluox:  $271,125 \pm 17,0$ , n=8, p<0,05) (Figura 3). Com relação aos braços abertos, a fluoxetina teve efeito oposto. Houve diminuição significativa do tempo de permanência, quando comparado ao grupo salina, no grupo desmame precoce (DS:  $83,25 \pm 24,62$  vs DF:  $11,12 \pm 9,12$ , n=8, p<0,05) (Figura 3).

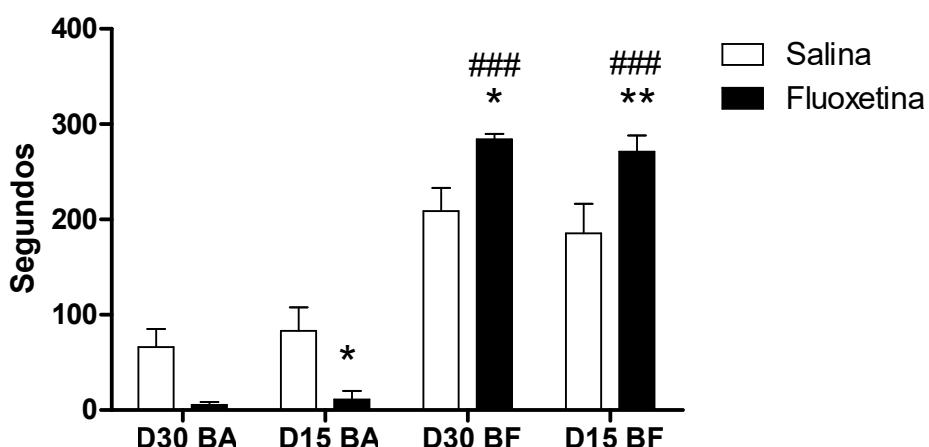


Figura 3. Efeitos do desmame precoce avaliado no teste do labirinto em cruz elevado. O tempo de permanência está expresso em segundos e representa a duração em que o animal estava em cada um dos quatro braços do labirinto. BA: Braço aberto. BF: Braço fechado. D30: Controle. D15: Desmame precoce. O teste foi realizado entre 194 e 197 dias de vida. ANOVA Two Way. Pós-teste de *Bonferroni*. Dados expressos em Média  $\pm$  Erro padrão da média \*p<0,05. \*\*p<0,01 vs Salina. ### p<0,001 vs BA do respectivo grupo controle ou desmame precoce. N=7-8.

### 3. CONSUMO ALIMENTAR NO TESTE DE SCS

O desmame precoce não alterou o consumo de dieta padrão quando comparado ao grupo controle (D30+DP Salina:  $6,45 \pm 0,86$  vs D15+DP Salina:  $7,04 \pm 1,09$ , n=6, p>0,05). Mesmo após a administração de fluoxetina, não

houve diferença no consumo de dieta padrão entre o grupo controle e desmame precoce (D30+DP Fluox:  $2,44 \pm 0,32$  vs D15+DP Fluox:  $2,71 \pm 0,49$ , n=6, p>0,05). Com relação ao consumo de cookie, o mesmo resultado foi observado. Não houve diferença significativa entre o consumo entre o grupo controle e desmame precoce nas análises sem fluoxetina (D30+CK Salina:  $6,03 \pm 0,64$  vs D15+CK Salina:  $5,06 \pm 0,7$ , n=6, p>0,05) ou com administração prévia de fluoxetina (D30+CK Fluox:  $3,8 \pm 0,78$  vs D15+CK Fluox:  $3,88 \pm 0,64$ , n=6, p>0,05). Foi observado, no entanto, um efeito da fluoxetina. A administração prévia da droga diminuiu o consumo de dieta padrão no grupo controle quando comparado ao consumo com administração de salina (D30+DP Salina:  $6,45 \pm 0,86$  vs D30+DP Fluox:  $2,44 \pm 0,32$ , n=6, p<0,001). O grupo desmamado precocemente também diminuiu o consumo de dieta padrão quando comparado ao grupo salina (D15+DP Salina:  $7,04 \pm 1,09$  vs D15+DP Fluox:  $2,71 \pm 0,49$ , n=6, p>0,05) (Figura 4). Com relação ao consumo de cookie, a fluoxetina não alterou o consumo em nenhum dos grupos analisados, nem o controle (D30+CK Salina:  $6,03 \pm 0,64$  vs D30+CK Fluox:  $3,8 \pm 0,78$ , n=6, p<0,001), nem o desmamado precocemente (D15+CK Salina:  $5,06 \pm 0,7$  vs D15+CK Fluox:  $3,88 \pm 0,64$ , n=6, p>0,05) (Figura 4).

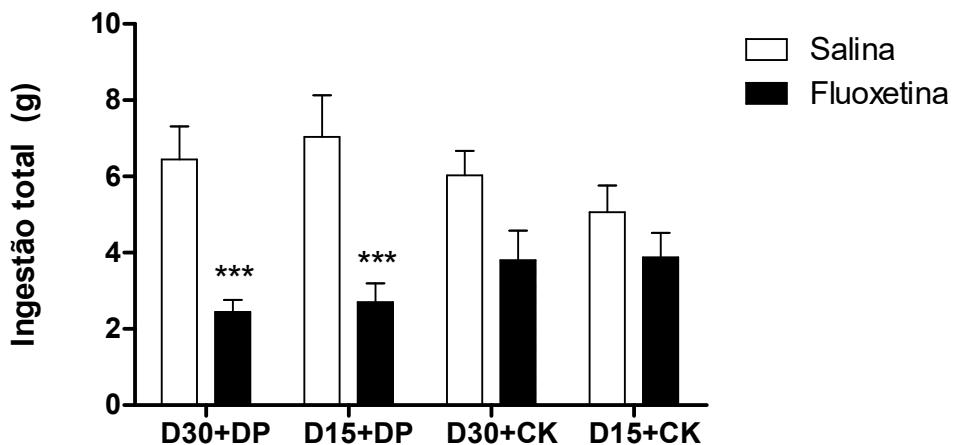


Figura 4. Efeitos do desmame precoce sobre o consumo de dieta padrão e palatável (cookie) durante a SCS. As ratas (N=6), por volta dos 200 dias de vida, foram submetidas à 4h de jejum, então avaliou-se a SCS em resposta à injeção aguda de solução salina ou fluoxetina. Foi ofertada cerca de 30g de dieta aos animais e permitida a ingestão por um período de 1h. O consumo foi

dado pela subtração entre a quantidade oferecida e a rejeitada após 1h. D30: Controle. D15: Desmame precoce. DP: Dieta Padrão. CK: Cookie. ANOVA Two Way. Pós-teste de *Bonferroni*. Dados expressos em Média ± Erro padrão da média. \*\*\* p<0,001 vs Salina.

#### 6.4. LATÊNCIA PARA INICIAR A REFEIÇÃO NO TESTE DE SCS

Quando comparado ao grupo controle, o desmame precoce não alterou a latência para iniciar a refeição durante a SCS, tanto nas análises com administração prévia de fluoxetina (D30+DP Fluox:  $198,37 \pm 75,01$  vs D15+DP Fluox:  $87,5 \pm 37,55$ , n=6, p>0,05), quanto naquelas com administração prévia de solução salina quando a dieta ofertada foi a padrão (D30+DP Salina:  $58,87 \pm 9,17$  vs D15+DP Salina:  $50,0 \pm 9,56$ , n=6, p>0,05). Com relação à latência, quando a dieta ofertada foi o cookie, o grupo desmame precoce apresentou menor latência para iniciar a refeição durante a SCS após a administração de fluoxetina (D30+CK fluox:  $141,37 \pm 80,28$  vs D15+CK fluox:  $5,87 \pm 3,28$ , n=8, p>0,001) (Figura 5).

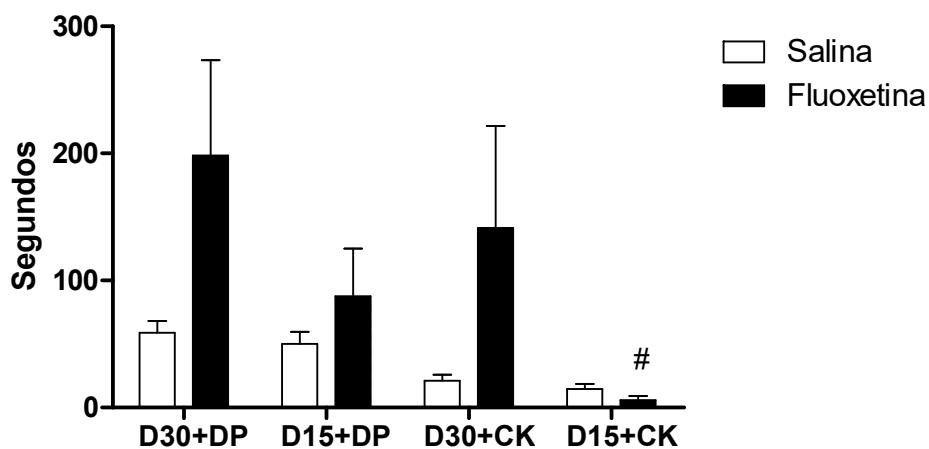


Figura 5. Efeitos do desmame precoce sobre a latência para iniciar a refeição durante a SCS. As ratas (N=6), por volta dos 200 dias de vida, foram submetidas à 4h de jejum, então avaliou-se a SCS em resposta à injeção aguda de solução salina ou fluoxetina. A latência é definida como o momento (em segundos) em que o animal inicia o primeiro episódio de ingestão alimentar durante a SCS. D30: Controle. D15: Desmame precoce. DP: Dieta Padrão. CK: Cookie. ANOVA Two Way. Pós-teste de *Bonferroni*. Dados

expressos em Média ± Erro padrão da média. # D15+CK fluox vs D30+CK fluox. p<0,05.

### 6.5. DURAÇÃO DA REFEIÇÃO NO TESTE DE SCS

O desmame precoce não alterou a duração da refeição durante a SCS, tanto nas análises com administração prévia de fluoxetina (D30+DP Fluox:  $615,75 \pm 105,67$  vs D15+DP Fluox:  $628,75 \pm 98,42$ , n=6, p>0,05), quanto naquelas com administração prévia de solução salina (D30+DP Salina:  $952,87 \pm 79,03$  vs D15+DP Salina:  $713,75 \pm 92,65$ , n=6, p>0,05), quando a dieta ofertada foi a padrão. Por outro lado, quando a dieta ofertada foi o cookie, o desmame precoce diminuiu a duração da refeição apenas após administração de solução salina (D30+CK salina:  $1400,9 \pm 176,8$  vs D15+CK salina:  $781,6 \pm 100,4$ , n=8, p<0,01), não havendo alteração após administração de fluoxetina. Foi observado efeito da dieta apenas no grupo controle, em que esse grupo apresentou maior duração no consumo de cookies quando comparado ao consumo de dieta padrão após administração de solução salina (D30+DP salina:  $952,9 \pm 79,03$  vs D30+CK salina:  $1400,9 \pm 176,8$ , n=8, p<0,05). Além disso, também foi observado um efeito da droga apenas no grupo controle com oferta de cookie, em que esse grupo apresentou menor duração da refeição após administração de fluoxetina (D30+CK salina:  $1400,9 \pm 176,8$  vs D30+CK fluox:  $938,1 \pm 176,8$ , n=8, p<0,05) (Figura 6)

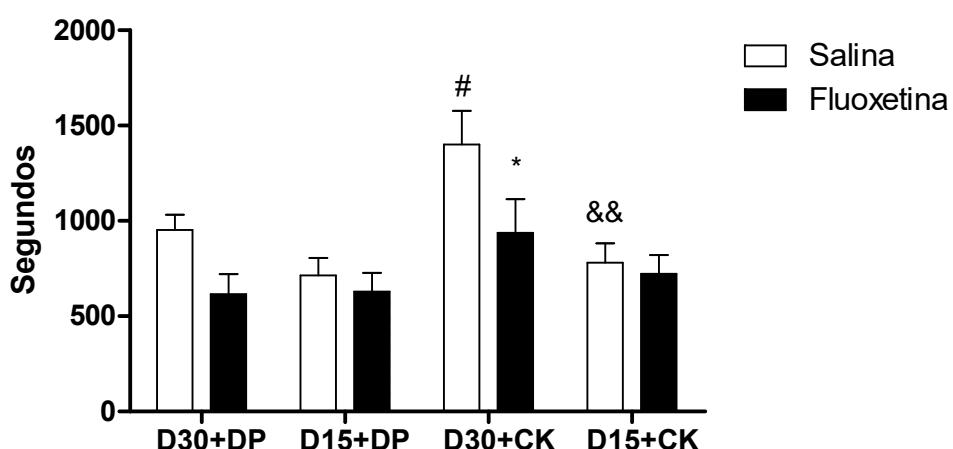


Figura 6. Efeitos do desmame precoce sobre a duração da refeição durante a SCS. As ratas (N=6), por volta dos 200 dias de vida, foram submetidas à 4h de jejum, então avaliou-se a SCS em resposta à injeção aguda de solução salina

ou fluoxetina. A duração da refeição foi dada pelo tempo (em segundos) em que o animal passou consumindo a dieta, durante a SCS. D30: Controle. D15: Desmame precoce. DP: Dieta Padrão. CK: Cookie. ANOVA Two Way. Pós-teste de *Bonferroni*. Dados expressos em Média ± Erro padrão da média. && D30+CK salina vs D15+CK salina ( $p<0,01$ ) (Efeito do desmame); # D30+DP salina vs D30+CK salina ( $p<0,05$ ) (Efeito da dieta); \* D30+CK salina vs D30+CK fluox ( $p<0,05$ ) (Efeito da droga).

## 6.6. TAXA DE ALIMENTAÇÃO NO TESTE DE SCS

O desmame precoce não alterou a taxa de alimentação durante a SCS quando comparado ao grupo controle. No entanto, foi observado um efeito intragrupo apenas no grupo desmame com dieta padrão, em que o grupo com administração de fluoxetina demonstrou uma menor taxa de alimentação quando comparado ao grupo salina (D15+DP salina:  $2,384 \pm 0,526$  vs D15+DP fluox:  $1,143 \pm 0,08$ ,  $n=8$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 7).

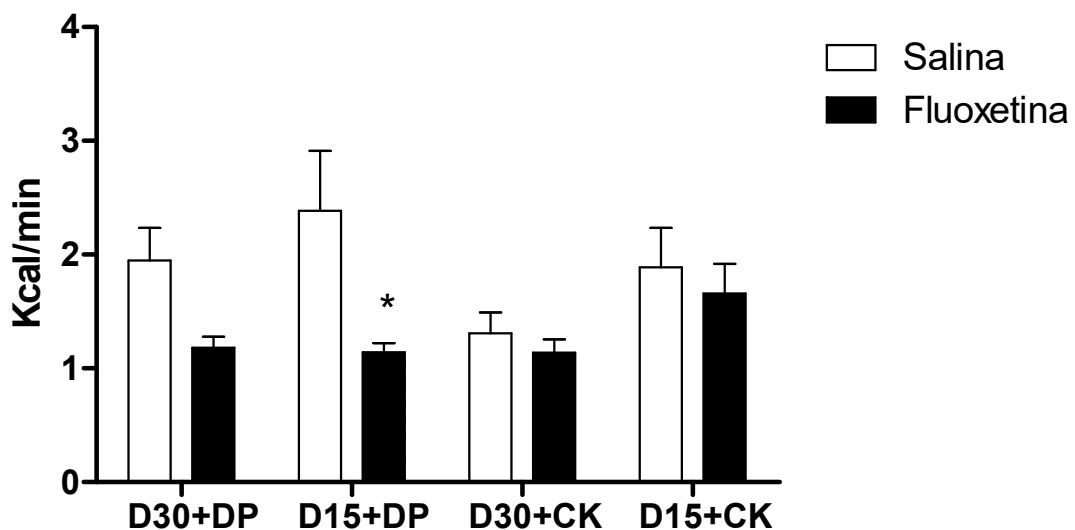


Figura 7. Efeitos do desmame precoce sobre a taxa de alimentação durante a SCS. As ratas ( $N=6$ ), por volta dos 200 dias de vida, foram submetidas à 4h de jejum, então avaliou-se a SCS em resposta à injeção aguda de solução salina ou fluoxetina. A taxa de alimentação é dada pela quantidade de calorias ingeridas (Kcal) por unidade de tempo (minutos), durante a SCS. D30: Controle. D15: Desmame precoce. DP: Dieta Padrão. CK: Cookie. ANOVA Two

Way. Pós-teste de *Bonferroni*. Dados expressos em Média  $\pm$  Erro padrão da média. \*p<0,05 vs D15+DP salina.

### 6.7. TAMANHO DA REFEIÇÃO NO TESTE DE SCS

O desmame precoce não alterou o tamanho da refeição durante a SCS quando comparado ao grupo controle. No entanto, foi observado efeito da fluoxetina em todos os grupos (D30+DP salina:  $78,80 \pm 14,21$  vs D30+DP fluox:  $25,91 \pm 4,16$ , n=6, p<0,05; D15+DP salina:  $85,85 \pm 20,03$  vs D15+DP fluox:  $38,92 \pm 7,37$ , n=6, p<0,05; D30+CK salina:  $101,07 \pm 12,05$  vs D30+CK fluox:  $49,08 \pm 5,97$ , n=6, p<0,05), exceto no grupo desmame + cookie (D15+CK). Portanto, a fluoxetina diminuiu a quantidade de dieta ingerida em todos os grupos, exceto no grupo desmame precoce com oferta de cookie (Figura 8).

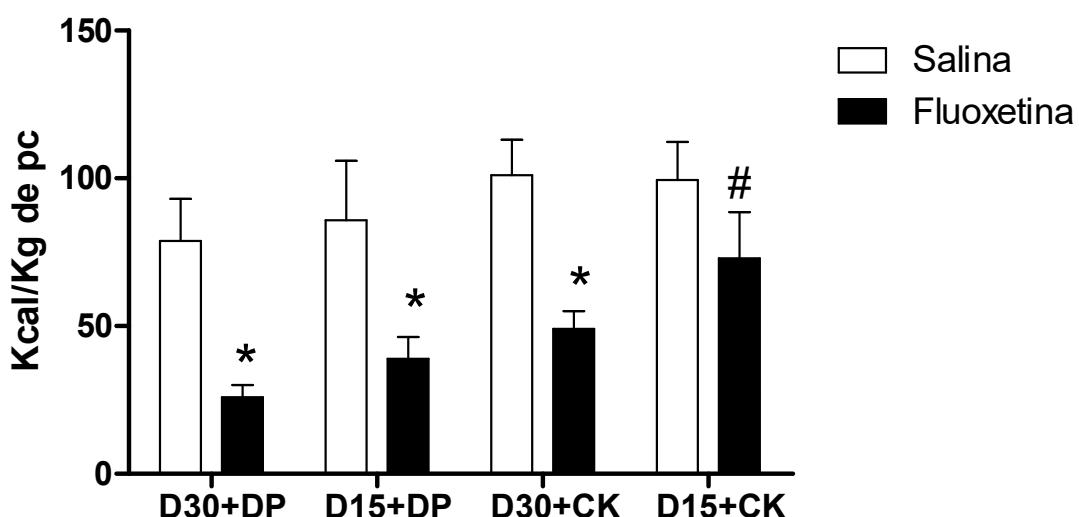


Figura 8. Efeitos do desmame precoce sobre o tamanho da refeição durante a SCS. As ratas (N=6), por volta dos 200 dias de vida, foram submetidas à 4h de jejum, então avaliou-se a SCS em resposta à injeção aguda de solução salina ou fluoxetina. O tamanho da refeição é dado pela quantidade de alimento ingerido (em Kcal) por unidade de peso corporal (em Kg). D30: Controle. D15: Desmame precoce. DP: Dieta Padrão. CK: Cookie. ANOVA Two Way. Pós-teste de *Bonferroni*. Dados expressos em Média  $\pm$  Erro padrão da média. \*p<0,05 vs salina. # p<0,05 vs D30+DP fluoxetina.

## 6.8. PONTO DE SACIEDADE NO TESTE DE SCS

O desmame precoce causa uma antecipação no ponto de saciedade quando a dieta ofertada é a padrão (Figura 9F), porém após a administração da fluoxetina o ponto de saciedade, para a dieta padrão, ocorreu mais tarde no animal desmamado (Figura 9B) quando comparado ao controle (Figura 9A). Quando a dieta ofertada foi o alimento palatável com administração da salina, os animais de ambos os grupos não foram capazes de completar a sequência. Entretanto após a administração de fluoxetina o ponto de saciedade dos animais desmamados se mostrou antecipado (Figura 9D).

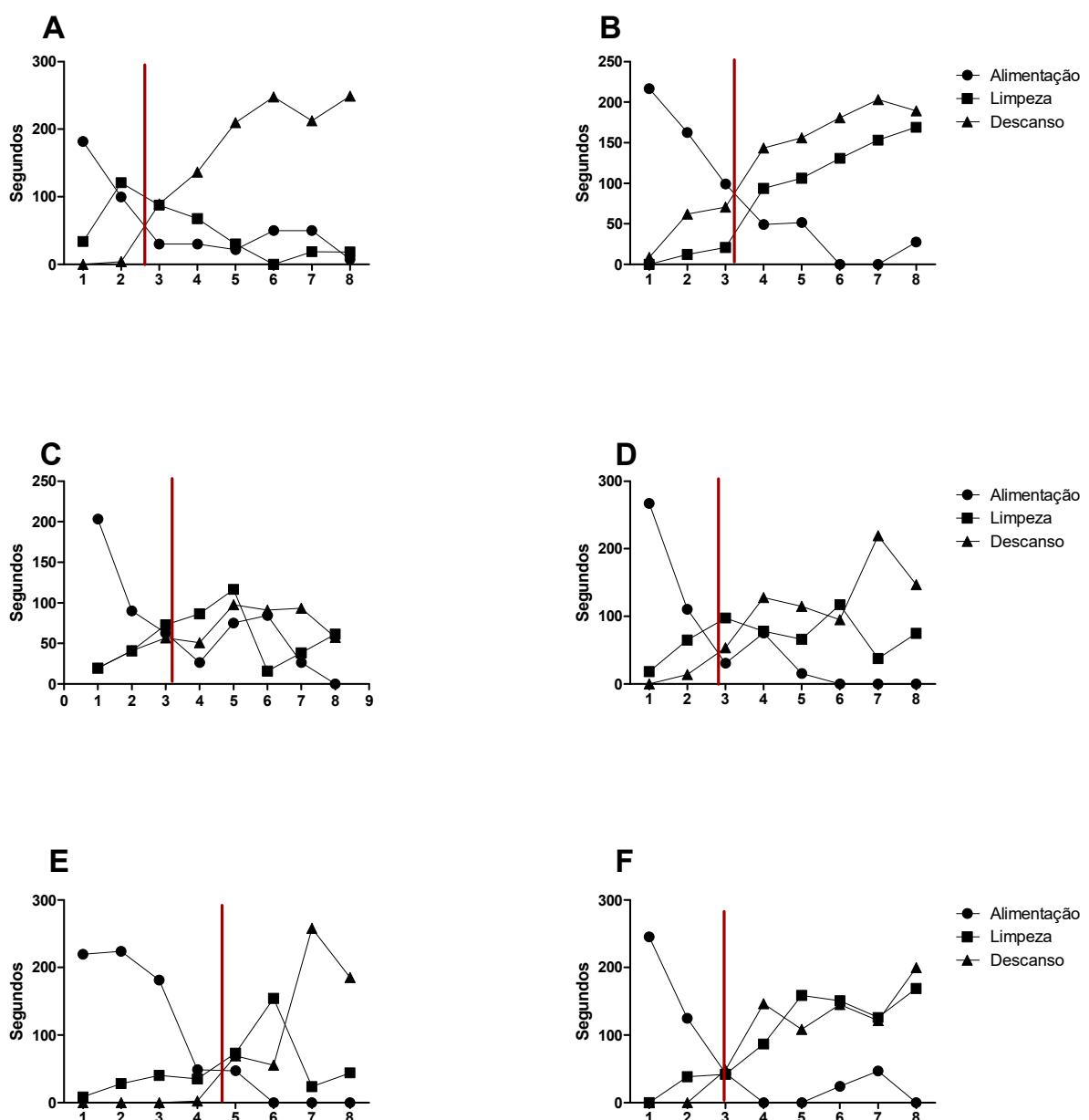


Figura 9. A figura demonstra os efeitos do desmame precoce sobre Ponto de

saciedade na SCS. A: D30+DP Fluoxetina; B: D15+DP Fluoxetina; C: D30+CK Fluoxetina; D: D15+CK Fluoxetina; E: D30+DP Salina; F: D15+DP Salina. Os períodos de 1 a 8 demonstram a frequência dos comportamentos de alimentação, limpeza e descanso em que, cada período, representa um tempo de 5 minutos. O ponto de saciedade é representado pela linha perpendicular vermelha, a qual indica o cruzamento entre a alimentação e o descanso. A e B: N=6; C, D, E, F: N=4.

## 7. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o desmame precoce não alterou o peso corporal das ratas avaliadas nesse período. Em relação aos níveis de ansiedade, os animais testados no labirinto em cruz elevado não mostraram diferenças entre os grupos. Entretanto, após a aplicação de fluoxetina os animais apresentaram maior comportamento similar à ansiedade em ambos os grupos avaliados nesse teste. Além disso, foi observado um efeito do desmame na latência para iniciar a refeição na SCS, quando a dieta ofertada foi uma dieta palatável. Nessa situação, a administração de fluoxetina diminuiu a latência apenas no grupo desmamado. Efeito do desmame também foi observado na duração da refeição na SCS, quando a dieta ofertada foi uma dieta palatável. Nesse caso, os animais apresentaram uma menor duração da refeição. Quanto à duração da refeição na SCS, ainda foi observado que os animais controle passam mais tempo na refeição quando o alimento é palatável, resultado não observado no grupo desmamado. Ademais, apenas no grupo controle a fluoxetina demonstrou efeito diminuindo a duração da refeição quando a dieta palatável era a opção. Quando se avaliou a taxa de alimentação, foi observado que, apenas o grupo de desmame precoce que consumiu a dieta padrão, teve a taxa diminuída com a administração de fluoxetina. Quanto ao tamanho da refeição, não foi observado um efeito do desmame precoce, entretanto, após a administração de fluoxetina, a quantidade de dieta ingerida em todos os grupos diminuiu, exceto no grupo desmame precoce com oferta de cookie. Quanto ao ponto de saciedade, houve no grupo desmamado quando comparado ao controle. O efeito oposto sobre a saciedade foi observado após administração de fluoxetina, ou seja, houve atraso no ponto de saciedade no grupo desmamado. O grupo com cookie e salina não foi avaliado porque o cookie perturbou a SCS, de maneira que os animais não demonstraram a SCS nessa condição.

Quando avaliado, o peso corporal não apresentou diferenças entre os animais desmamados precocemente e os animais controle. Isso pode ser justificado devido à idade do animal, pois, em outros estudos com animais desmamados precocemente, o peso se mostra alterado em um momento próximo do desmame, devido à interrupção abrupta do aleitamento materno (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011). Entretanto, ao avançar da idade, seu

peso se equipara ao de animais que não foram desmamados precocemente (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011).

Em estudo com fêmeas desmamadas precocemente, foi observado um maior peso corporal nesses animais quando avaliados aos 35 e 40 dias de vida (TAVARES, et al., 2020). Entretanto, um outro estudo que avaliou o peso corporal de fêmeas desmamadas precocemente com 4 e 7 semanas, não observou diferenças significativas entre os grupos (KODAMA, et al., 2008). Em avaliações feitas com camundongos fêmeas desmamadas precocemente, em que o peso corporal foi avaliado com 3, 5 e 8 semanas, foi observado que o peso das fêmeas foi alterado em apenas uma das avaliações não persistindo, portanto, essa diferença em longo prazo (KIKUSUI, KIYOKAWA, MORI, 2007). Um estudo com machos que realizou o desmame em três idades diferentes, aos 15, 21 e 30 dias de vida, também avaliou o peso corporal desses animais. As avaliações foram feitas diariamente até o dia 30 e, depois, a cada 30 dias até o dia 150. Observou-se que as diferenças ocorreram apenas entre os dias 16 e 18, não sendo mais observadas até o último dia de avaliação, aos 150 dias de vida do animal (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011).

Como citado anteriormente, essa alteração de peso apenas no período próximo ao desmame pode estar associada à interrupção abrupta do aleitamento materno, que tem composição nutricional diferente da dieta padrão (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011). Cerca de 69,8% das calorias do leite materno são de gordura, enquanto que os carboidratos representam apenas 6,8% dessa composição (AZARA, et al., 2008). Por outro lado, a dieta padrão de biotério tem 64% de suas calorias provindas de carboidrato e 16,7% de lipídios (REEVES, 1993). Em condições normais, o animal no período final de lactação, inicia a ingestão de alimentos, mas ainda ingere o leite materno até o desmame completo (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011).

Quanto aos parâmetros do comportamento similar à ansiedade, avaliado através do labirinto em cruz elevado, não foram encontradas diferenças significativas dos dados obtidos de animais desmamados precocemente em relação ao grupo controle. Esse achado pode estar relacionado ao fato de que os animais utilizados no presente trabalho foram apenas fêmeas, corroborando com achados de outros estudos que avaliaram o comportamento similar à ansiedade em teste de labirinto com ratos *wistar* machos e fêmeas.

desmamados precocemente. O teste foi realizado quando os animais tinham 8 semanas de vida, e foram encontradas diferenças apenas nos animais machos, mas não em fêmeas. Os machos passaram menor tempo e apresentaram menor frequência de entrada nos braços abertos e maior tempo de permanência nos braços fechados, indicando um aumento da ansiedade nesses animais (ITO, et al., 2006). Isso demonstra que as consequências do desmame precoce apresentam diferenças quanto ao sexo do animal e, nesse sentido, os machos estariam mais suscetíveis (ITO, et al., 2006).

Um outro estudo que avaliou os animais desmamados precocemente, em teste de labirinto, em uma idade mais próxima a utilizada no presente estudo, com 22 semanas, demonstrou que tanto os machos quanto as fêmeas desmamados precocemente apresentavam um comportamento similar à ansiedade elevado, com um menor número de entradas no braço aberto, menor latência para entrar nos braços fechados e maior latência para entradas em braços abertos. Entretanto, nesse estudo, os animais utilizados foram camundongos (KIKUSUI, TAKEUCHI, MORI, 2004) e possíveis diferenças inerentes às espécies devem ser consideradas quando os estudos são comparados. Esse grupo também avaliou esses mesmos animais com 3, 5 e 8 semanas e os resultados foram similares, com o desmame precoce aumentando os níveis do comportamento similar à ansiedade tanto em machos quanto em fêmeas (KIKUSUI, et al., 2006).

Por outro lado, quando realizaram as avaliações dos mesmos parâmetros com 3, 5 e 8 semanas, em uma linhagem diferente de animais (*ICR mice*) submetidos ao desmame precoce, notaram que as fêmeas, diferente dos machos, apresentavam uma elevação da ansiedade apenas na terceira semana, não sendo mais observado nas avaliações seguintes, endossando a hipótese de que as consequências do desmame precoce apresentam diferenças quanto ao sexo do animal (KIKUSUI, KIYOKAWA, MORI, 2007). Os autores sugerem que essas diferenças sexuais podem surgir, pelo menos em parte, dos hormônios sexuais, pois as respostas neuroendócrinas ao estresse são parcialmente reguladas pelos hormônios gonadais e, portanto, são diferentes em homens e mulheres. Por isso, o estresse do desmame precoce pode afetar os níveis de corticosterona de forma diferente em homens e

mulheres, o que, por sua vez, pode causar diferenças nos resultados comportamentais (KIKUSUI, KIYOKAWA, MORI, 2007).

Além disso, em estudo mais recente com ratos *Wistar*, o comportamento similar a ansiedade em teste de labirinto foi avaliado com 4 e 7 semanas, em animais machos e fêmeas. Eles observaram que as fêmeas, diferentes dos machos, apresentavam menor duração e frequência de entrada em braços abertos e maior duração em braços fechados apenas com 4 semanas, e que esse comportamento parecia desaparecer com sete semanas (KODAMA, et al., 2008). Esses achados corroboram com as hipóteses de que as respostas neuroendócrinas ao estresse são reguladas pelos hormônios gonadais e, portanto, o desmame precoce afeta os níveis de corticosterona de forma diferente para machos e fêmeas (KODAMA, et al., 2008). Nesse sentido o presente trabalho corrobora com esses achados de que as fêmeas apresentam ter uma maior proteção contra os efeitos do desmame precoce quanto aos níveis de comportamento similar à ansiedade, e pode ser devido aos hormônios gonadais. Entretanto, mais estudos deverão ser realizados para elucidar o que, de fato, ocorre no período perinatal que tornaria os animais machos mais susceptíveis a esse comportamento mais tarde na vida.

Quando avaliou-se a resposta dos animais ao teste de labirinto após a administração de fluoxetina, foi observado que os níveis de comportamento similar à ansiedade se apresentavam elevados em todos os grupos, isso se deve ao fato de que a fluoxetina é uma droga de ação sistêmica, que age, especificamente, inibindo a recaptação de serotonina, (SSRIs) e sua administração aguda causa uma resposta ansiogênica inicial, através do aumento da neurotransmissão via 5-HT2C (GRAEFF, 2008). Nesse sentido, o desmame precoce não foi capaz de promover alterações nesses mecanismos.

Quanto aos parâmetros avaliados no teste de sequência comportamental de saciedade, os dados de consumo alimentar não apresentaram diferenças na ingestão de dieta palatável e padrão dos animais desmamados precocemente quando comparados aos animais do grupo controle, ao contrário do que foi demonstrado em outros estudos. Avaliações realizadas com fêmeas desmamadas precocemente mostraram que, essas, apresentam maior consumo de dieta padrão quando comparadas com fêmeas controles em consumo durante 24h. Esses dados são mostrados tanto em avaliações com

fêmeas jovens com 35 dias (TAVARES, et al., 2020), quanto nas avaliações em longo prazo, que mostram que essa diferença tende a permanecer até os 180 dias (SOARES, et al., 2021). Além disso, foi demonstrado em ratos machos adultos, que foram desmamados aos 15 ou 30 dias, que os animais desmamados precocemente mostraram uma hiperfagia com relação à dieta palatável (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011). Esses animais foram avaliados quanto à preferência por dieta palatável ao ofertar a mesma juntamente com a ração padrão aos 120 dias de vida do animal. O consumo foi avaliado por 24h e o animal desmamado precocemente apresentou um maior consumo da dieta palatável quando comparado com o animal controle, demonstrando, assim, a hiperfagia com relação à dieta palatável desse animal (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011). No presente estudo, o desmame não foi capaz de promover hiperfagia pela dieta padrão ou palatável em ratas fêmeas adultas que foram desmamadas precocemente. Por outro lado, foi observado que, após a administração de fluoxetina o consumo foi reduzido, em ambos os grupos, apenas quando a dieta ofertada foi a padrão. Tendo em vista que a fluoxetina tem ação anorexigênica, o esperado seria que todos os consumos fossem reduzidos, o fato desse resultado não ser apresentado quando o alimento foi palatável, pode sugerir que a regulação da alimentação frente a esse tipo de dieta envolve outros mecanismos que superariam a regulação serotoninérgica. Contudo, neste estudo, não foi avaliada essa resposta com outras drogas de ações específicas, nem se realizaram avaliações estruturais que permitissem justificar essa hipótese.

Embora não tenham sido observadas alterações no consumo, a análise da Sequência Comportamental de Saciedade permite avaliar outros parâmetros do comportamento alimentar, como a latência para iniciar a refeição e a duração da refeição. Apesar de não ser um teste específico, o parâmetro da latência pode ser uma medida da motivação do animal para comer (OLIVEIRA, SOUZA, MANHÃES-DE-CASTRO, 2011). O desmame precoce foi capaz de diminuir a latência para o início da refeição quando o alimento foi palatável, após a aplicação de fluoxetina. Sabe-se que a fluoxetina tem ação anorexígena. É de se esperar que um reflexo desse efeito inibidor da ingestão se mostre também no interesse que o animal demonstra pelo alimento. Nesse caso, um menor interesse pelo alimento levaria a uma maior latência para

começar a refeição. No entanto, foi observado o efeito oposto no grupo desmamado, em que eles apresentaram uma menor latência para iniciar a ingestão, mesmo sob efeito da droga, quando a dieta foi palatável. Esse achado pode estar associado às características palatáveis do cookie de chocolate, grande quantidade de açúcares simples e gordura, pois é sabido que o desmame precoce é um modelo de estresse que promove alterações em longo prazo, inclusive com o aumento de resposta a estímulos estressores mais tarde na vida (KIKUSUI, et al., 2004), que podem ser pela hiperatividade do eixo HPA e aumento dos níveis circulantes de glicocorticoides (MEANEY, PLOTSKY, 2000). Esses glicocorticoides tendem a aumentar o consumo de sacarose para compensar o estresse (DALLMAN, et al., 2003) e, nesse caso, o jejum prévio utilizado no teste poderia ser um fator estressor para esses animais (NAKAMURA, et al., 2008) e, assim, justificar o maior interesse desses pelo alimento palatável.

Em estudo com animais machos desmamados precocemente, em que se avaliou o parâmetro de motivação com teste específico (teste de corredor) aos 120 dias, foi observado que esses animais diminuíram a velocidade com que buscavam a recompensa alimentar, o que pode ser interpretado como uma motivação menor para obter uma recompensa alimentar. Porém, essa menor motivação apareceu como efeito transitório e, portanto, seria inadequado afirmar que animais desmamados precocemente são menos motivados pela recompensa alimentar (DO AMARAL ALMEIDA, et al., 2021).

Assim, embora não tenha sido evidenciado um maior consumo, pode-se sugerir que o interesse por esse tipo de alimento, observado no presente estudo, foi maior entre o grupo desmamado. Outros estudos demonstraram que animais desmamados precocemente apresentam uma preferência por alimentos palatáveis, principalmente ricos em gordura, e têm o consumo aumentado quando entram em contato com essas dietas. Entretanto, mais uma vez, essa característica também parece estar presente apenas em machos (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011), não sendo observada em ratas fêmeas (SOARES, et al., 2021). O dimorfismo sexual observado pode estar associado aos níveis plasmáticos dos hormônios sexuais e/ou suas quantidades de receptores nesses animais.

Assim como a latência foi menor para iniciar a refeição, a duração desta refeição também foi menor no grupo desmamado quando o alimento ofertado foi o cookie. Nesse caso, o baixo valor hedônico com relação ao alimento palatável poderia ser demonstrado pela menor duração da refeição com esse alimento. Junto aos dados da latência, esses dados levantam a questão de se esses animais apresentam um maior “querer” e um menor “gostar”. Sabe-se que o “querer” no comportamento alimentar hedônico está associado à motivação por determinado alimento, ou seja, se refere ao período em que ainda não há contato com a dieta. O “gostar”, por sua vez, está associado ao valor hedônico do alimento em si e se expressa após o contato com a dieta (MORALES; BERRIDGE, 2020; SASAKI, 2017). Assim, pode-se especular que uma menor latência parece sugerir um maior “querer”, enquanto uma menor duração parece sugerir um menor “gostar” nesses animais. Esses resultados associados estão relacionados ao comportamento de vício, observado no uso de drogas e que, recentemente, tem sido sugerido que, de forma similar, esse mecanismo indicaria um “vício alimentar” (BERRIDGE, ROBINSON, 2016). Em teste específico para avaliação do “gostar” em animais desmamados precocemente, foi realizado uma avaliação do teste de reatividade ao paladar com 90 dias em ratos machos, e foi observado que o desmame precoce reduziu o tempo que os animais gastaram no consumo da solução de sacarose. Esse comportamento pode ser indicativo de uma reação diminuída ao prazer, que tende a ser recompensada para atingir os padrões de recompensa alimentar (DO AMARAL ALMEIDA, et al., 2021).

Além disso, também foi observado, neste trabalho, que a administração prévia de fluoxetina foi capaz de reduzir a duração da alimentação de cookies nos animais controle, mas não nos animais desmamados precocemente, o que pode endossar a hipótese de que a regulação da alimentação frente a esse tipo de dieta envolve mecanismos que superariam a regulação serotoninérgica, principalmente nos animais desmamados precocemente, apesar deste estudo não ter avaliado essa resposta com outras drogas de ação específica, nem ter realizado avaliações estruturais que permitissem justificar essa hipótese. Por outro lado, seguindo a associação anterior foi feita desta microestrutura da sequência, a duração, com o componente do comportamento alimentar hedônico o “gostar”, é sabido que esse componente possui maior regulação

pelo sistema opioidérgico (BERRIDGE, ROBINSON, 2016). Estudos desse sistema, em animais desmamados precocemente, demonstraram que animais que receberam antagonista do receptor opioidérgico dos 15 aos 30 dias de vida, em avaliação do teste de reatividade ao paladar com 90 dias, apresentaram normalização do tempo de exposição à sacarose, quando comparado aos resultados de animais desmamados sem administração desse antagonista, sugerindo uma possível normalização na percepção do prazer nesses animais pela droga opioidérgica sabidamente relacionada à esse componente do comportamento alimentar (DO AMARAL ALMEIDA, et al., 2021).

Quanto à taxa de alimentação (Kcal/min), o desmame precoce não foi capaz de promover uma alteração na taxa de alimentação durante a SCS quando comparado ao grupo controle. No entanto, após a administração de fluoxetina foi observado uma menor taxa de alimentação no grupo desmame com dieta padrão, quando comparado ao grupo salina consumindo a mesma dieta. Esse foi um dado esperado, tendo em vista que a fluoxetina foi capaz de reduzir o consumo dessa dieta nos animais desmamados precocemente, sem alterar a duração da refeição acarretando, portanto, em uma menor taxa de alimentação, apesar de que o grupo controle também apresentou esse padrão de comportamento de diminuição de consumo e manutenção da duração. Todavia, não foi demonstrada alteração na taxa após a administração de fluoxetina sugerindo, portanto, que o desmame precoce promove alterações nos mecanismos de regulação do comportamento alimentar em resposta à fluoxetina.

Em relação ao tamanho da refeição (Kcal/Kg de pc), o desmame precoce não alterou o tamanho da refeição durante a SCS quando comparado ao grupo controle. No entanto, a fluoxetina diminuiu o tamanho da refeição em todos os grupos, demonstrando sua ação anorexigênica esperada. Por outro lado, essa ação da fluoxetina não foi capaz de diminuir o tamanho da refeição nos animais desmamados precocemente quando o alimento era palatável. Além do envolvimento de outros mecanismos regulatórios da alimentação frente a uma dieta palatável que foram discutidos anteriormente, o desmame precoce promove alterações na regulação da alimentação através de alterações do sistema serotoninérgico. Estudos com fêmeas jovens que avaliou

a expressão dos genes dos receptores 5ht1b, 5ht2c e do SERT no tronco encefálico e hipotálamo dessas ratas, observaram que havia uma diminuição na expressão de RNAm desses receptores no hipotálamo e que, por outro lado, estavam aumentados no tronco. Esses achados, sugerem que o sistema serotoninérgico no tronco cerebral se ajustou para produzir e liberar menos serotonina. Nesse caso, ambas as regiões, hipotálamo e tronco cerebral, estariam trabalhando sinergicamente. Enquanto o hipotálamo diminuiria os receptores para responder menos à serotonina que vem do tronco encefálico, essa região, por outro lado, aumentaria os receptores e o transportador para inibir a liberação de serotonina (TAVARES, et al., 2020), o que poderia justificar a menor ação anorexígena da droga observada no presente estudo.

Além disso, quanto ao ponto de saciedade, o desmame precoce parece causar uma antecipação no ponto de saciedade observado no teste quando a dieta ofertada é a padrão, porém após a administração da fluoxetina o ponto de saciedade ocorreu mais tarde no animal desmamado quando comparado ao controle, podendo estar associado às alterações do sistema serotoninérgico de fêmeas desmamadas precocemente já citadas em outro estudo (TAVARES, et al., 2020), que podem estar acarretando nessa menor ação anorexígena da droga que vista nesses animais. Quando a dieta ofertada foi o alimento palatável, na ausência de um anorexígeno, apenas com administração da salina, os animais de ambos os grupos não foram capazes de completar a sequência, sugerindo que esse tipo de dieta poderia atrapalhar o ciclo alimentar esperado do animal e afetar a saciedade. Entretanto, após a administração de fluoxetina, o ponto de saciedade dos animais desmamados se mostrou antecipado, quando a dieta foi o cookie, resultado que interage diretamente com a diminuição da duração da alimentação quando o alimento foi palatável e, portanto, podendo ser justificado pela mesma razão de que o animal desmamado precocemente parece estar mais motivado pela dieta palatável, com menor latência para iniciar a refeição, mas com uma percepção de prazer alterada que resulta em um menor tempo de contato com essa dieta.

Isso demonstra que o desmame precoce não é capaz de promover alterações no comportamento alimentar perceptíveis em condições normais de laboratório. Porém, na presença de um fator estimulador, um possível efeito latente pode se tornar aparente (DOS SANTOS OLIVEIRA, et al., 2011). Essa

sugestão é baseada em achados com animais submetidos a insultos no período perinatal que só apresentam, de forma mais evidente, as consequências deletérias da “programação” ocorrida no início da vida quando enfrentam uma nova situação estressora na vida adulta (DE SOUZA, et al., 2020).

## 8. CONCLUSÃO

O desmame precoce promove alterações no comportamento alimentar, as quais são melhor evidenciadas quando o desmame é associado a um outro estímulo ambiental, como a dieta palatável e/ou a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico com o uso da fluoxetina.

## REFERÊNCIAS

- ALONSO-CARABALLO, Y. et al. Enhanced anxiety-like behavior emerges with weight gain in male and female obesity-susceptible rats. *Behavioural brain research*, v. 360, p. 81-93, 2019.
- ANDERMANN, Mark L.; LOWELL, Bradford B. Toward a wiring diagram understanding of appetite control. *Neuron*, v. 95, n. 4, p. 757-778, 2017.
- ARCHIBALD, Alyssa J.; DOLINSKY, Vernon W.; AZAD, Meghan B. Early-life exposure to non-nutritive sweeteners and the developmental origins of childhood obesity: global evidence from human and rodent studies. *Nutrients*, v. 10, n. 2, p. 194, 2018.
- AZARA, Cintia RP et al. Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups. *Biological research*, v. 41, n. 3, p. 317-330, 2008.
- BELLISLE, France et al. Sweetness, satiation, and satiety. *The Journal of nutrition*, v. 142, n. 6, p. 1149S-1154S, 2012.
- BERRIDGE, Kent C.; ROBINSON, Terry E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?. *Brain research reviews*, v. 28, n. 3, p. 309-369, 1998.
- BERRIDGE, Kent C.; ROBINSON, Terry E. Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *American Psychologist*, v. 71, n. 8, p. 670, 2016.
- BRUNSTROM, Jeffrey M.; CHEON, Bobby K. Do humans still forage in an obesogenic environment? Mechanisms and implications for weight maintenance. *Physiology & Behavior*, v. 193, p. 261-267, 2018.
- BURT, C. W. et al., Ambulatory medical care utilization estimates for 2005. *Advance Data*, v. 388, p. 1-15, 2007.

COLANTUONI, Carlo et al. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obesity research*, v. 10, n. 6, p. 478-488, 2002.

DALLMAN, Mary F. et al. Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 20, p. 11696-11701, 2003.

DALLMAN, Mary F. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 21, n. 3, p. 159-165, 2010.

DAVIS, Michael et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 105-135, 2010.

DE FERNANDES TEIXEIRA, João. O que é filosofia da mente. 2009.

DE FERNANDES TEIXEIRA, João. A Filosofia da Mente no Século XXI. *Revista Ágora Filosófica*, v. 20, n. 1, p. 81-94, 2020.

DE MATOS FEIJÓ, Fernanda; BERTOLUCI, Marcello Casaccia; REIS, Cíntia. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 57, n. 1, p. 74-77, 2011.

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

DE SOUZA, Julliet Araújo et al. Dual exposure to stress in different stages of development affects eating behavior of male Wistar rats. *Physiology & behavior*, v. 214, p. 112769, 2020.

DE SOUZA, Julliet Araújo et al. Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 192, 2020.

DO AMARAL ALMEIDA, Larissa Cavalcanti et al. Blockade of Opiodergic System During Early Weaning Reverts Feeding Behavior Altered Patterns. *Neuroscience*, v. 463, p. 254-263, 2021

DOS SANTOS OLIVEIRA, Lisiane et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. *Behavioural processes*, v. 86, n. 1, p. 119-124, 2011.

DOS SANTOS OLIVEIRA, Lisiane et al. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. *Behavioural processes*, v. 86, n. 1, p. 75-80, 2011.

EVANS, Sharon et al. How does feeding development and progression onto solid foods in PKU compare with non-PKU children during weaning?. *Nutrients*, v. 11, n. 3, p. 529, 2019.

GRAEFF, Guilherme. Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs. 2008.

GRENIER, Stéphane; BARRE, Philippe; LITRICO, Isabelle. Phenotypic plasticity and selection: nonexclusive mechanisms of adaptation. *Scientifica*, v. 2016, 2016.

GRILL, Harvey J.; NORGREN, Ralph. The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain research*, v. 143, n. 2, p. 281-297, 1978.

GURY, Carlos; COUSIN, F. Pharmacokinetics of SSRI antidepressants: half-life and clinical applicability. *L'encephale*, v. 25, n. 5, p. 470-476, 1999.

HALFORD, Jason CG; WANNINAYAKE, Shamila CD; BLUNDELL, John E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 61, n. 2, p. 159-168, 1998.

HANDLEY, SL; MITHANI, S. Effects of alphaadrenoceptor agonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour, *Archiv Pharmacol* 327: 1– 5, 1984.

HEISLER, L. K et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. **Neuron**, v.51, n.2, p.239-249, 2006.

HÜPPI, Petra S. Growth and development of the brain and impact on cognitive outcomes. **Importance of Growth for Health and Development**, v. 65, p. 137-151, 2010.

ISMAIL, Fatima Yousif; FATEMI, Ali; JOHNSTON, Michael V. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 21, n. 1, p. 23-48, 2017.

ITO, Akie 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.

JÄGER, Susanne et al. Breast-feeding and maternal risk of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 57, n. 7, p. 1355-1365, 2014.

JUNIOR, Aydamari João Pereira Faria; DE TOLEDO NERIS, Ana Raquel Mendes; DE OLIVEIRA, Iara Peixoto. Epigenética e Psicologia: Uma Possibilidade de Encontro entre o Social e o Biológico. **Revista Internacional em Língua Portuguesa**, n. 34, p. 15-36, 2018.

KANARI, Kahoru et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural brain research**, v. 156, n. 1, p. 45-52, 2005.

KEUNEN, Kristin; COUNSELL, Serena J.; BENDERS, Manon JNL. The emergence of functional architecture during early brain development. **Neuroimage**, v. 160, p. 2-14, 2017.

KODAMA, Yuka et al. Effects of early weaning on anxiety and prefrontal cortical and hippocampal myelination in male and female Wistar rats. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 50, n. 4, p. 332-342, 2008.

KOLB, Bryan; MYCHASIUK, Richelle; GIBB, Robbin. Brain development, experience, and behavior. **Pediatric blood & cancer**, v. 61, n. 10, p. 1720-1723, 2014

KOLB, Bryan; HARKER, Allonna; GIBB, Robbin. Principles of plasticity in the developing brain. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 59, n. 12, p. 1218-1223, 2017.

KOLB, Bryan. Brain plasticity and experience. In: **The neurobiology of brain and behavioral development**. Academic Press, 2018. p. 341-389.

KIKUSUI, Takefumi; TAKEUCHI, Yukari; MORI, Yuji. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 1, p. 37-42, 2004.

KIKUSUI, Takefumi et al. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. **Behavioural brain research**, v. 175, n. 1, p. 96-103, 2006.

KIKUSUI, Takefumi; KIYOKAWA, Yasushi; MORI, Yuji. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain research**, v. 1133, p. 115-122, 2007.

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

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

LAM, D. D. et al. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 97, n.1, p.84-91, 2010.

LEE, Michelle D.; CLIFTON, Peter G. Role of the serotonergic system in appetite and ingestion control. In: **Handbook of Behavioral Neuroscience**. Elsevier, 2020. p. 469-487.

LI, Yi et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2016.

LIU, Clarissa M.; KANOSKI, Scott E. Homeostatic and non-homeostatic controls of feeding behavior: Distinct vs. common neural systems. **Physiology & behavior**, v. 193, p. 223-231, 2018.

MEANEY, Michael J.; PLOTSKY, Paul M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. The biological basis for mind body interactions, v. 122, p. 81, 2000.

MEEUSEN, Romain. Exercise and the brain. In: **13th ISEI symposium**. 2017. p. 24-28.

M AFKHAMI-ARDEKANI AND H SEDGHI. Effect of fluoxetine on weight reduction in obese patients, Indian Journal of Clinical Biochemistry, v.20, n.1, p.135-138, 2005.

MCEWEN, Bruce S. et al. Mechanisms of stress in the brain. Nature neuroscience, v. 18, n. 10, p. 1353-1363, 2015.

MCLEAN, Carmen P.; MILLER, Nathan A.; HOPE, Debra A. Mediating social anxiety and disordered eating: The role of expressive suppression. Eating Disorders, v. 15, n. 1, p. 41-54, 2007.

MCNAUGHTON, Neil; ZANGROSSI JR, Hélio. Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. Handbook of behavioral neuroscience, v. 17, p. 11-27, 2008.

MILLER, Melanie J. et al. Raising girls and boys in early China: Stable isotope data reveal sex differences in weaning and childhood diets during the eastern Zhou era. American journal of physical anthropology, v. 172, n. 4, p. 567-585, 2020.

MOORE, Celia L.; MORELLI, Gilda A. Mother rats interact differently with male and female offspring. Journal of comparative and physiological psychology, v. 93, n. 4, p. 677, 1979.

MORALES, Ileana; BERRIDGE, Kent C. 'Liking'and 'wanting'in eating and food reward: Brain mechanisms and clinical implications. *Physiology & behavior*, p. 113152, 2020.

NAKAMURA, Kayo 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.

OGRODNIK, Mikolaj et al. Obesity-induced cellular senescence drives anxiety and impairs neurogenesis. *Cell metabolism*, v. 29, n. 5, p. 1061-1077. e8, 2019.

OLIVEIRA, M. M. et al. Maternal deprivation by early weaning causes the nocicept into alter the palatability and cookie consumption. **International Journal of Developmental Research**, v.11, n.5, p.47011-47017, 2021.

OLIVEIRA, Lisiane dos Santos; SOUZA, Sandra Lopes de; MANHÃES-DE-CASTRO, Raul. Behavioral satiety sequence: an experimental model for studying feeding behavior. *Revista de Nutrição*, v. 24, p. 619-628, 2011.

PARSONS, C. E. et al. The functional neuroanatomy of the evolving parent–infant relationship. *Progress in neurobiology*, v. 91, n. 3, p. 220-241, 2010.

PECINA, Susana; BERRIDGE, Kent C. Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do  $\mu$ -opioids cause increased hedonic impact of sweetness?. *Journal of neuroscience*, v. 25, n. 50, p. 11777-11786, 2005.

PECINA, Susana et al. Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 28, p. 9395-9402, 2003

PHELAN, Suzanne et al. Maternal behaviors during pregnancy impact offspring obesity risk. *Experimental diabetes research*, v. 2011, 2011.

PRINZ, Philip; STENGEL, Andreas. Control of food intake by gastrointestinal peptides: mechanisms of action and possible modulation in the treatment of obesity. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 23, n. 2, p. 180, 2017.

REES, Sandra; HARDING, Richard. Brain development during fetal life: influences of the intra-uterine environment. **Neuroscience letters**, v. 361, n. 1-3, p. 111-114, 2004.

REEVES, Philip G. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

ROLLS, Edmund T. A neuroscience levels of explanation approach to the mind and the brain. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 15, 2021.

Richards S, Mychasiuk R, Kolb B, et al. Tactile stimulation during development alters behavior and neuronanatomical organization in normal rats. *Behav Brain Res* 2012;231:86–91.

RICHTER, S. Helene et al. A time to wean? Impact of weaning age on anxiety-like behaviour and stability of behavioural traits in full adulthood. *PloS one*, v. 11, n. 12, p. e0167652, 2016.

ROGERS, R. J. et al., Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 97, n.1, p.3-14, 2010.

SAH, Anupam et al. Epigenetic mechanisms within the cingulate cortex regulate innate anxiety-like behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 4, p. 317-328, 2019.

SALVATO, Fernanda; LABATE, C. A. Epigenética. In: Universidade de São Paulo. Seminário em genética e melhoramento de plantas. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lgn/pub/seminar/FSalvato-200702-Resumo.pdf>. Acesso em. 2021.

SAMPLE, Camille H. et al. Western diet and the weakening of the interoceptive stimulus control of appetitive behavior. *Behavioural brain research*, v. 312, p. 219-230, 2016.

SARKI, Mahesh; PARLESAK, Alexandr; ROBERTSON, Aileen. Comparison of national cross-sectional breast-feeding surveys by maternal education in Europe (2006–2016). *Public health nutrition*, v. 22, n. 5, p. 848-861, 2019.

SASAKI, Tsutomu; MATSUI, Sho; KITAMURA, Tadahiro. Control of appetite and food preference by NMDA receptor and its co-agonist d-serine. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, p. 1081, 2016.

SASAKI, Tsutomu. Neural and molecular mechanisms involved in controlling the quality of feeding behavior: diet selection and feeding patterns. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1151, 2017.

SCHMID, Max; GUILLAUME, Frédéric. The role of phenotypic plasticity on population differentiation. *Heredity*, v. 119, n. 4, p. 214-225, 2017.

SCHWARTZ, Michael W. et al. Obesity pathogenesis: an endocrine society scientific statement. *Endocrine reviews*, v. 38, n. 4, p. 267-296, 2017.

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

SIGULEM, Dirce Maria et al. Obesidade na infância e na adolescência. *Compacta Nutr*, v. 2, p. 7-15, 2001.

SOARES, Patricia Novaes et al. Late effects of early weaning on food preference and the dopaminergic and endocannabinoid systems in male and female rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, p. 1-11, 2021.

SOUZA, C. G. et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life sciences*, v. 81, n. 3, p. 198-203, 2007.

STEVENSON, Richard J.; FRANCIS, Heather M. The hippocampus and the regulation of human food intake. *Psychological bulletin*, v. 143, n. 10, p. 1011, 2017.

TAVARES, Gabriel Araujo et al. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations. **Behavioural processes**, v. 170, p. 103981, 2020.

TAVARES, Gabriel Araújo et al. Early weaning modulates eating behavior and promotes hypofunction of the serotonergic (5HT) system in juvenile male rats. International Journal of Developmental Neuroscience, v. 80, n. 3, p. 209-219, 2020.

TAVARES, Gabriel Araújo et al. Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats. Behavioural brain research, v. 383, p. 112531, 2020.

TELES SILVA, Melissa et al. Immediate and Late Effects of Early Weaning on Rat Gastric Cell Differentiation. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 1, p. 196, 2020.

TOVOTE, Philip; FADOK, Jonathan Paul; LÜTHI, Andreas. Neuronal circuits for fear and anxiety. Nature Reviews Neuroscience, v. 16, n. 6, p. 317-331, 2015.

VASQUES DA COSTA, Aline; PURCELL GOES, Carolina; GAMA, Patrícia. Breastfeeding importance and its therapeutic potential against SARS-CoV-2. Physiological Reports, v. 9, n. 3, p. e14744, 2021.

VILLAR, José et al. Late weaning and maternal closeness, associated with advanced motor and visual maturation, reinforce autonomy in healthy, 2-year-old children. Scientific reports, v. 10, n. 1, p. 1-27, 2020.

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

Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. Neurosci Biobehav Rev 2008;32:1073–1086.

WONG, D. T. et al. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. Life Sciences, v.57, n.5, p.211-241, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global nutrition targets 2025: breastfeeding policy brief. World Health Organization, 2014.

ZULIAN, Juliana Guimarães et al. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.