

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

TAISY CINTHIA FERRO CAVALCANTE

**CONTROLE HIPOTALÂMICO DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR NEONATAL E DESNUTRIÇÃO**

**RECIFE
2016**

TAISY CINTHIA FERRO CAVALCANTE

**CONTROLE HIPOTALÂMICO DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR NEONATAL E DESNUTRIÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientadora: Dr^a. Sandra Lopes de Souza
Co-orientadora: Dr^a. Amanda Alves Marcelino
da Silva

**RECIFE
2016**

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C376c Cavalcante, Taisy Cinthia Ferro.
Controle hipotalâmico do comportamento alimentar neonatal e
desnutrição / Taisy Cinthia Ferro Cavalcante. – 2016.
113 f. : il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Neonato. 2. Hipotálamo. 3. Núcleos da rafe. 4. Fenfluramina. 5.
Ingestão alimentar. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-080)

TAISY CINTHIA FERRO CAVALCANTE

**CONTROLE HIPOTALÂMICO DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR NEONATAL E DESNUTRIÇÃO**

Tese Aprovada: 29 / 02 / 2016

Dr^a. Rhowena Jane Barbosa de Matos (CAV-UFPE)

Dr^a. Amanda Alves Marcelino da Silva (UPE)

Dr^a. Manuela Figueiroa Lira de Freitas (UFPE)

Dr^a. Renata Cristinny de Farias Campina (UFPE)

Dr^a. Thays Kallyne Marinho de Souza (UPE)

**Recife
2016**

Dedico esta tese ao Grupo de Pesquisa Neuroplasticidade e Comportamento

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, José Gomes Cavalcante Neto e Edgenalva Oliveira Ferro Cavalcante, por terem me guiado e por fazerem parte da minha vida.

Aos meus irmãos, Tícia, Tício, Talitta e Túlio que me fizeram ser quem sou hoje e sempre estiveram comigo.

Aos meus sobrinhos Clara e Davi por alegrarem meus dias.

A minha orientadora, professora Sandra Lopes de Souza por me ter acolhido no grupo, por todos os momentos especiais e por toda experiência passada ao longo de quatro anos.

A minha co-orientadora, Amanda Marcelino, que passou por tudo ao longo do mestrado e doutorado, sempre disposta a ajudar e apoiando nos momentos mais difíceis. Obrigada por todo apoio, pelos momentos de risadas e por sua amizade sincera.

As amigas Larissa e Renata que sempre me deram apoio e palavras de incentivo para os novos desafios em muitos momentos ao longo desses quatro anos.

As amigas Juliette, Matilde, Isabelle e Livia pelos bons momentos compartilhados,

A Prof^a Elizabeth Nascimento por ter contribuído na minha formação, desde o início quando era uma aluna de iniciação científica e durante o mestrado.

Ao Dr. França, obrigada pela disponibilidade e o apoio. Os seus ensinamentos foram de grande valia para que o trabalho tivesse sucesso. Tenho grande respeito pelo senhor e admiração por sua história de vida.

Aos estagiários Jordy e Gabriel que contribuíram no trabalho árduo com os animais.

As minhas amigas Denise Gomes, Renata Sobreira e Marcela Marmo, pela presença em minha vida e por sempre me apoiarem nas decisões tomadas.

Aos professores da Pós-Graduação em Nutrição conhecimentos compartilhados.

As secretárias, Neci e Cecília pela atenção na pós-graduação, sempre pacientes em nos orientar e informar como tudo deveria ser feito.

Aos animais que tornaram possível a realização do trabalho cedendo suas vidas para a ciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a construção dessa tese. Obrigada por tudo!

“Se você pode sonhar, você pode fazer”.

Walt Disney

RESUMO

A maturação do sistema de controle de ingestão alimentar pode se moldar em correspondência ao ambiente nutricional, direcionando o seu padrão maduro. Nos primeiros dias de vida, no rato, o principal mediador para a saciedade e fome é a informação de enchimento ou esvaziamento gástrico, respectivamente. Esta informação nesse período é coordenada notadamente pela periferia provavelmente pela a imaturidade do controle central. O controle da ingestão alimentar homeostático é coordenado pelo núcleo do trato solitário e pelos núcleos hipotalâmicos que através de diferentes moléculas, como sensores energéticos, peptídeos e neurotransmissores coordena os sinais oriundos de tecidos periféricos. Portanto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a maturação de controle da ingestão alimentar em ratos neonatos e o papel do sistema serotoninérgico nesse processo. Foram utilizados ratos Wistar em duas idades P10 e P18 submetidos à desnutrição proteica ou não. Foram realizados os seguintes procedimentos experimentais: avaliação de ingestão alimentar, expressão gênica de peptídeos e sensores energéticos no hipotálamo de animais normonutridos e ativação de c-fos em resposta a agonista serotoninérgico no hipotálamo e núcleos da rafe em animais submetidos à desnutrição ou não. Nossos resultados revelaram que os sensores hipotalâmicos respondem precocemente ao estado de jejum (AMPK α 1 -10dias: $16,79 \pm 1,01$, $P=0,0174$ e mTOR -10 dias: $J=37,50 \pm 2,67$, $p=0,036$) e alimentado (AMPK α 1 10dias: $C=11,39 \pm 1,17$ e mTOR aos 10 dias: $C=48,74 \pm 4,21$). A desnutrição promove inibição da via serotoninérgica além de reduzir a ativação de células imunorreativas aos 18 dias no núcleo PVN (Desnutrido-Fenfluramina: $200,8 \pm 24,38$, $n=5$, versus Desnutrido-Salina: $234,5 \pm 43,32$, $n=5$ $p<0,006$), traduzido em maior ganho de peso dos animais Desnutrido-Fenfluramina ($2,32\pm0,36$ $n=10$; $p=0,017$) em relação ao grupo Desnutrido-Salina ($1,19\pm0,24$ $n=10$). Portanto, nossos resultados revelam que o controle da ingestão alimentar em neonatos é afetado pela desnutrição com alterações na via serotoninérgica aos 18 dias e que os sinalizadores hipotalâmicos aos 10 dias participam sobre o controle da ingestão de alimentos.

Palavras-chave: Neonato. Hipotálamo. Núcleos da rafe. Fenfluramina. Ingestão alimentar.

ABSTRACT

The maturation of food intake patterns can be shaped in correspondence to the nutritional environment, directing his mature standard. In the first days of life in the rats, the main mediator for satiety and hunger is filling or gastric emptying, respectively. This information in this period is coordinated notably the periphery probably due to immaturity of the central control. The homeostatic control of food intake is coordinated by the nucleus of the solitary tract and the hypothalamic nuclei by different molecules, such as energy sensors, peptides and neurotransmitters coordinates signals from the periphery. Therefore, the objective of this study was to evaluate the control of maturation of food intake in newborn rats. Wistar rats were used at ages P10 and P18 submitted to protein malnutrition or not. The following experimental procedures were performed: assessment of food intake, gene expression of peptides and energy sensors in the hypothalamus of control animals and c-fos activation in response to agonist serotonin in the hypothalamus and raphe nuclei in animals subjected to malnutrition or not. Our results revealed that the hypothalamic sensors early answer to the fasting state (AMPK α 1 10days: $16,79 \pm 1,01$ p = 0,0174) and mTOR at 10 days (J = $37,50 \pm 2,67$; p = 0.036) and fed (AMPK α 1 10days: C = $11,39 \pm 1,17$ and mTOR at 10 days: C = $48,74 \pm 4,21$). Malnutrition promotes inhibition of serotonin pathway and reduces the activation of immunoreactive cells after 18 days in the PVN core (Low protein-Fenfluramine: $200,8 \pm 24,38$; n = 5, versus Low protein-Salina: $234,5 \pm 43,32$; n = 5 p <0.006), translated into higher weight gain of Low protein-Fenfluramine animals ($2,32 \pm 0,36$; n = 10; p = 0,017) compared to the group Low protein-Salina ($1,19 \pm 0,24$, n = 10). Therefore, our results show that the control of food intake in newborns is affected by malnutrition to changes in serotonin via at 18 days and that the hypothalamic sensors at 10 days for the control of food intake.

Keywords: Newborn. Hypothalamus. Raphe nuclei. Fenfluramine. Food intake.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1: Regulação da ingestão alimentar: participação dos núcleos hipotalâmicos e diferentes estruturas periféricas sobre o controle homeostático.	19
Figura 2: Apresentação de estímulos e da via sinalização celular dos sensores nutricionais AMPK e mTOR.	24
Figura 3: Etapas da síntese e metabolismo da serotonina dentro de um neurônio serotoninérgico.	27
Figura 4: Representação das projeções encefálicas do sistema serotoninérgico em roedores. A figura mostra fibras representativas indicando vias serotoninérgicas cerebrais do rato em diferentes cores.	28
Figura 5: Representação esquemática dos sítios de ação da serotonina sobre a via das melanocortinas	30
Diagrama 1: Ilustração dos grupos experimentais	43

Figuras do Artigo 1

Figura1: Efeito do jejum sobre a expressão gênica de sensores nutricionais e peptídeos hipotalâmicos.	55
Figura 2: Efeito de carga calórica e não sobre a expressão gênica de sensores nutricionais e peptídeos hipotalâmicos.	57

Figuras do Artigo 2

Figura1: Percentual de ganho de peso de animais dos grupos controle e desnutridos em resposta à fenfluramina.	74
Figura 2: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos hipotalâmicos de animais controle e desnutrido aos 10 dias de vida.	76
Figura 3: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos dorsal (A) e mediano da rafe (B) aos 10 dias de vida.	77
Figura 4: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos hipotalâmicos de animais controle e desnutrido aos 18 dias de vida.	79
Figura 5: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos dorsal (A) e mediano da rafe (B) aos 18 dias de vida.	80

LISTA DE TABELAS

TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para análise da expressão gênica	42
Tabela 2: Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação.	43

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1: Primers utilizados para análise da expressão gênica	52
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AgRP	Peptídeo relacionado ao gene agouti
AMPK	5'adenosine monophosphate-activated protein kinase
ARC	Núcleo arqueado
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CART	Transcrito relacionado à cocaína e a anfetamina
c-Fos	Marcador de atividade neuronal
CLi	Linear caudal da rafe
CRH	Hormônio liberador da corticotropina
DEPTOR	DEP domínio proteína ligadora de mtor
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
DR	Dorsal da rafe
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
LH	Hipotálamo lateral
MAO	Enzima monoaminooxidase
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MgR	Núcleo Magno da rafe
mLST8	Mammalian letal com Sec-13 proteína 8
MnR	Mediano da rafe
mSin1	Proteína 1 mamífero estresse ativado quinase integrante
mTOR	The Mammalian Target of Rapamycin
NPY	Neuropeptídeo Y
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PnR	Pontino da rafe
POMC	Pró-opiomelanocortina
PP	Poli-peptídeo pancreático
PPY	Peptídeo tirosina tirosina
PRAS40	Prolina-rica Akt substrato de 40 kda
Protor	Proteína ligante ao Rictor
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
Raptor	Proteína reguladora associada do mtor
Rictor	Rapamicina-insensível à ligação do mtor
RLi	Núcleo linear rostral da rafe
Rob	Núcleo Obscuro da rafe
Rpa	Núcleo Pálido da rafe
SERT	Proteína de recaptação de serotonina
TRH	Hormônio liberador da tireotrofina
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 CONTROLE ENCEFÁLICO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E SENSORES ENERGÉTICOS.....	17
2.2 SEROTONINA E CONTROLE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR HOMEOSTÁTICO	26
2.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E MECANISMOS DE CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR	30
2.4 DESNUTRIÇÃO PERINATAL E COMPORTAMENTO ALIMENTAR	34
3 JUSTIFICATIVA.....	38
4 HIPÓTESES.....	38
5 OBJETIVOS	39
OBJETIVO GERAL.....	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6 MÉTODOS	40
6.1 ANIMAIS	40
6.2 EXPERIMENTO 1	40
GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
ANÁLISE DE PCR-QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	41
6.3 EXPERIMENTO 2	42
GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	44
6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
7 RESULTADOS	48
7.1 ARTIGO 1	49
EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS HIPOTALÂMICOS E SENSORES NUTRICIONAIS NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NEONATOS	49
7.2 ARTIGO 2	66
EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL E DA AÇÃO DA FENFLURAMINA SOBRE A INGESTÃO ALIMENTAR E ATIVAÇÃO NEURONAL NO HIPOTÁLAMO E NÚCLEOS DA RAFE DE RATOS NEONATOS	66
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE	106
APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO DURANTE VIGÊNCIA DO DOUTORADO	106
ANEXOS	111
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	111
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1	112
ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2	113

1 APRESENTAÇÃO

Diferentes insultos durante a vida perinatal e infância estão associados a adaptações metabólicas e comportamentais que podem se relacionar ao desenvolvimento de doenças a longo prazo. Um dos sistemas orgânicos mais vulneráveis as agressões em períodos iniciais da vida é o nervoso, especialmente por apresentar períodos críticos de desenvolvimento. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a maturação de controle da ingestão alimentar em ratos neonatos e o papel do sistema serotoninérgico nesse processo. Foram avaliados o consumo alimentar, a expressão gênica dos sensores nutricionais e neuropeptídeos hipotalâmicos e atividade encefálica em resposta a droga serotoninérgica. O presente estudo foi dividido em duas partes: A) Estudo da expressão dos sensores nutricionais e peptídeos hipotalâmicos em resposta a ao estado de jejum e distensão gástrica calórica ou não. Os sensores nutricionais analisados foram o AMPK e o mTOR expressos no hipotálamo, cuja ativação indica o nível energético da célula. Dentre os peptídeos analisados da via orexigênica, temos o NPY e o AgRP e da anorexigênica o POMC e o CART. Utilizamos a técnica da reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR) para análise da expressão gênica. B) Efeito da desnutrição perinatal sobre a maturação do controle serotoninérgico da ingestão alimentar. A literatura é vasta sobre as influências de manipulações perinatais sobre o controle do comportamento alimentar, entretanto o estudo na vida neonatal é escasso. O conhecimento da expressão de mecanismos hipotalâmicos de controle do comportamento alimentar durante o período de lactação, bem como os efeitos de influências ambientais adversas sobre estes, pode dar subsídios para possíveis intervenções a fim de minimizar consequências na vida adulta. Além disso, o sistema serotoninérgico tem se mostrado uma via importante no controle o comportamento adulto, contudo pouco se sabe quando esse sistema

passa atuar ativamente no controle da ingestão alimentar. Para isto utilizamos a técnica de imunohistoquímica para proteína c-Fos em resposta ao estímulo farmacológico e alimentar.

Os resultados do presente estudo estão organizados em dois artigos científicos originais submetidos à publicação, intitulados e submetidos às seguintes revistas:

- 1) “*Hypothalamic peptide and nutriente sensors gene expression in the hypothalamus of neonatal rat*”, submetido ao periódico Developmental Neuroscience (Qualis A2).
- 2) “*Effects of perinatal protein malnutrition and fenfluramine action on food intake and neuronal activation in the hypothalamus and raphe nuclei of neonate rat*”, submetido ao periódico Physiology & Behavior (Qualis A2).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle encefálico do comportamento alimentar e sensores energéticos

O comportamento alimentar é definido pela associação de fatores extrínsecos (socioeconômicos, culturais) e intrínsecos (controle neural e metabólico do organismo) do indivíduo (LUTTER e NESTLER, 2009). Este comportamento pode ser distinguido entre dois fenômenos, fome e apetite. A fome define a necessidade fisiológica de se alimentar (LUTTER e NESTLER, 2009), e quanto ao apetite refere-se ao desejo específico por determinado alimento (HILL *et al.*, 1984). Esses processos são controlados por dois mecanismos, um *homeostático* (Figura 1), centrado no *hipotálamo* e outro *hedônico* relacionado com o *sistema de recompensa alimentar* (SHIN *et al.*, 2009). Sendo o produto final entre a ingestão alimentar e o gasto energético definido como balanço energético (JEQUIER e TAPPY, 1999).

O hipotálamo é estrutura do diencefalo constituído de vários núcleos. O hipotálamo divide-se em três planos frontais: *hipotálamo supra-óptico* contendo os núcleos supraquiasmático, supra-óptico e paraventricular; *hipotálamo tuberal* contendo os núcleos ventromedial, dorsomedial e arqueado (ou infundibular); e *hipotálamo mamilar* contendo os núcleos mamilar e posterior (DANIEL, 1976). Apesar de todos os núcleos hipotalâmicos estarem envolvidos no controle do apetite, dentre estes, o núcleo arqueado (ARC) é área que recebe muitos sinais periféricos integrando sinais de fome e de saciedade (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Sinais periféricos hormonais, particularmente do trato gastrointestinal, convergem para o núcleo arqueado por este apresentar uma barreira hematoencefálica mais permeável (WYNNE *et al.*, 2005).

No ARC estão localizados os *neurônios de primeira ordem* que co-expressam os neuropeptídeos orexigênicos: neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao gene agouti

(AgRP), bem como os neuropeptídeos anorexigênicos: pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e a anfetamina (CART) (BLOUET e SCHWARTZ, 2010). Os axônios destes neurônios projetam-se para os *neurônios de segunda ordem* localizados em outros núcleos hipotalâmicos, dentre estes, o núcleo paraventricular (PVN), onde são secretadas as substâncias anoréticas hormônio liberador da tireotrofina (TRH), hormônio liberador da corticotropina (CRH), ocitocina, hipotálamo lateral (LH) e área perifornical, onde são expressas as substâncias orexigênicas hormônio concentrador de melanina (MCH) e orexina (WYNNE *et al.*, 2005). O núcleo dorsomedial (DMH) recebe projeções de NPY originadas do ARC enquanto o ventromedial recebe projeções de neurônios imunoreativos para NPY, AgRP e POMC (WYNNE *et al.*, 2005). Recentemente foi destacada a elevada expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) dentro no núcleo ventromedial, cuja expressão promove acentuada redução da deprivação alimentar (XU *et al.*, 2003). Além de todos esses sinais neurais, sinalizadores periféricos também são capazes de influenciar a ação do hipotálamo sobre o controle da ingestão alimentar (VALASSI *et al.*, 2008). Quando os sinais da adiposidade, e de saciedade alcançam o ARC, os peptídeos anoréticos são liberados e ativam o circuito anabólico (VALASSI *et al.*, 2008). Por outro lado, quando os sinais da adiposidade estão baixos e de fome elevados, o circuito catabólico é ativado pela liberação dos peptídeos orexigênicos (VALASSI *et al.*, 2008).

Figura1 - Regulação da ingestão alimentar: participação dos núcleos hipotalâmicos e diferentes estruturas periféricas sobre o controle homeostático.

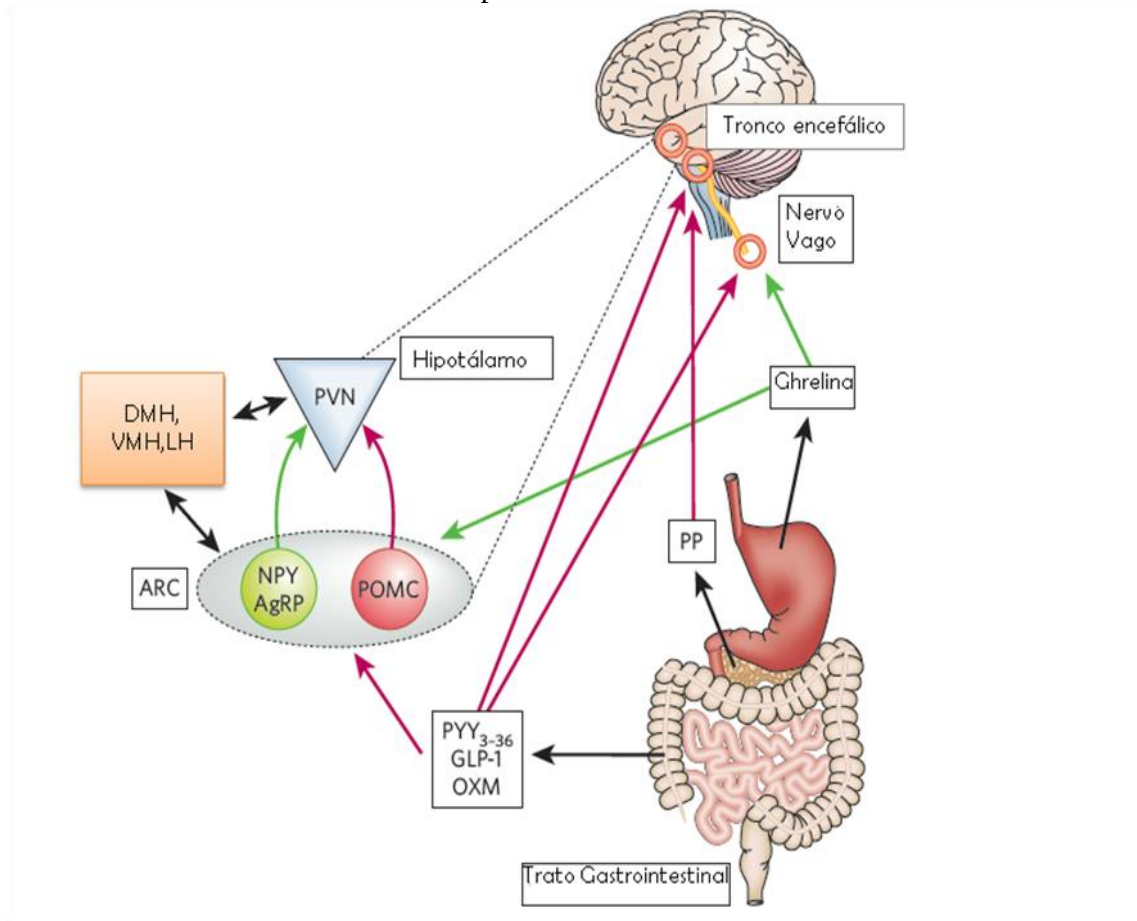


Figura adaptada do artigo “Gut hormones and the regulation of energy homeostasis”, Murphy and Bloom, NATURE, Vol 444, 2006.

Diferentes sinais são liberados periféricamente em resposta a fome ou à saciedade (NASLUND e HELLSTROM, 2007). Estes sinais são divididos em dois grupos: a) *Sinais de adiposidade*, leptina e adiponectina, liberadas pelo tecido adiposo e insulina pelo pâncreas, são considerados reguladores a longo prazo da ingestão alimentar (NASLUND e HELLSTROM, 2007). A leptina liberada na corrente sanguínea age diretamente no núcleo arqueado do hipotálamo, estimulando neurônios anorexigênicos que expressam POMC e CART e inibe neurônios orexigênicos que expressam NPY e AgRP, o que reduz a ingestão alimentar (BASKIN *et al.*, 1999). A adiponectina também liberada pelos adipócitos é capaz de estimular a saciedade através da ação sobre o sistema de melancortinas presente

principalmente no núcleo paraventricular do hipotálamo (QI *et al.*, 2004). Da mesma forma, a insulina liberada pelas células beta do pâncreas, em resposta aos níveis de glicose, é capaz de inibir a ingestão alimentar, através da estimulação de neurônios anorexigênicos e inibição de orexigênicos (BASKIN *et al.*, 1999). Têm-se a participação de *sinais de fome e saciedade, entre outros*: ghrelina liberada pelas células oxínticas do estômago em resposta a períodos de jejum. A ghrelina é a substância até o momento, liberada periféricamente, promove aumento da ingestão alimentar (GIL-CAMPOS *et al.*, 2006). Ela age através do estímulo de neurônios que expressão peptídeos orexigênicos (NPY/AgRP) (GIL-CAMPOS *et al.*, 2006). A colestocinina (CCK) é liberada pelas células duodenais, principalmente em resposta a ingestão de dietas gordurosas, age centralmente via nervo vago-núcleo trato solitário, através de dois receptores CCKa e CCKb (DOCKRAY, 2012). A liberação de colestocinina promove a redução da frequência e do tamanho da refeição (DOCKRAY, 2012). Outros peptídeos liberados em resposta à saciedade são oxintomodulina, polipeptídeo pancreático (PP), Peptídeo tirosina tirosina (PYY), Peptídeo semelhante ao glucagon -1 (GLP-1) agem em curto prazo estimulando o término da refeição (CHAUDHRI *et al.*, 2008). A oxintomodulina é liberada pelas células L do intestino em resposta a ingestão alimentar e ao conteúdo calórico da refeição. O PYY é liberado pela células L do intestino, sob duas isoformas, PYY₍₁₋₃₆₎ e PYY₍₃₋₃₆₎. A concentração de PYY é baixa durante o jejum aumentando rapidamente após a refeição, respondendo ativamente a ingestão de gordura mais do que a de carboidrato e proteína (DUCA *et al.*, 2013). O PP é liberado pelas células pancreáticas das ilhotas de Langerhans, age diretamente no hipotálamo e no tronco encefálico através do receptor RY4, reduzindo a ingestão alimentar (DUCA *et al.*, 2013). O GLP-1 é liberado pelo intestino, é capaz de promover redução da ingestão alimentar, suprime a secreção do glucagon, e retarda o esvaziamento gástrico (PARKER *et al.*, 2014).

Os neurônios hipotalâmicos respondem a este controle através da ativação de sensores nutricionais, que são capazes de indicar o nível de energia da célula (Figura 2). Estes sensores estão expressos em diversos tipos celulares, como músculo esquelético, coração, fígado, tecido adiposo, células beta pancreáticas e especialmente no hipotálamo (KIM e LEE, 2005). O mTOR (The Mammalian Target of Rapamycin) é uma proteína treonina-serina quinase com importantes funções como síntese proteica, organização do citoesqueleto, diferenciação celular, desenvolvimento, sobrevivência e envelhecimento, sinalizador do crescimento celular e do estado energético (MARTINEZ DE MORENTIN *et al.*, 2014) (Figura 2). O mTOR compreende dois complexos protéicos mTORC1 e mTORC2, cada um modulado por diferentes estímulos (INOKI e GUAN, 2006). O mTORC1 é estimulado pelo stress, por aminoácidos, níveis de energia (ATP), o mTORC2 por fatores de crescimento. Em mamíferos, o mTORC1 funciona como um homodímero, com cada monômero como um agredado de estruturas e proteínas funcionais diferentes, incluindo: a) uma subunidade catalítica mTOR; b) PRAS40 (prolina-rica Akt substrato de 40 KDa); c) Raptor (proteína reguladora associada do mTOR); d) mLST8 (mammalian letal com Sec-13 proteína 8); e) DEPTOR (DEP domínio proteína ligadora de mTOR). Todos estes componentes apresentam importantes funções para a atividade quinase do mTORC1, entre estes podemos destacar o DEPTOR tendo ação inibitória da atividade do mTORC1. O mTORC2 é formado por 3 componentes, são eles: a) Rictor (rapamicina-insensível a ligação do mTOR); b) mSin1 (proteína 1 mamífero estresse ativado quinase integrante); c) Protor (proteína ligante ao Rictor). O Rictor é o ligante essencial para a formação do complexo mTOR2 e também como substrato de ligação (MARTINEZ DE MORENTIN *et al.*, 2014). Acredita-se que a hiperatividade do mTOR2 esteja relacionada com o surgimento de crescimento sem controle de diferentes tipos celulares (ZHOU e HUANG, 2010).

De maneira geral, o aumento ou a diminuição da atividade do mTOR pode levar ao desenvolvimento de câncer, diabetes e obesidade. Há relatos que o mTOR é capaz de modular os níveis de leptina e insulina (ROH *et al.*, 2003; VANDER HAAR *et al.*, 2007). O mTOR é expresso no tálamo, córtex, hipocampo e em núcleos do hipotálamo (COTA *et al.*, 2006), especialmente no arqueado co-localizado em neurônios que expressam NPY e POMC (COTA *et al.*, 2006). Devido a isso, evidências mostram que o mTOR pode ser capaz de regular a ingestão alimentar. Os níveis de mTOR estão relacionados com o aumento dos níveis de ATP na célula. Desta forma, o mTOR pode sinalizar o balanço positivo do estado energético da célula (MARTINEZ DE MORENTIN *et al.*, 2014).

Um outro sensor nutricional é o AMPK (5'adenosine monophosphate-activated protein kinase) uma serina/treonina quinase, que pode ser ativada em resposta ao estresse ambiental ou nutricional, fatores como depleção dos níveis intracelulares de ATP, hipóxia, hipoglicemia, infarto do miocárdio e exercício prolongado (STARK *et al.*, 2013) (Figura 2). Independentemente, o resultado da ativação do AMPK é inibição do consumo de energia através de vias metabólicas, bem como da síntese de ácidos graxos e esteróis, e ativação da produção de ATP por vias catabólicas, tal como oxidação de ácidos graxos (KIM e LEE, 2005). A regulação da atividade do AMPK se dá por uma via complexa, envolvendo a ativação alostérica pelo AMP, em resposta ao aumento intracelular da razão AMP/ATP e da fosforilação através modificação covalente via a cascata da AMPK quinase também ativado alostericamente pelo AMP (RAMAMURTHY e RONNETT, 2012). No músculo esquelético o AMPK é ativado durante o exercício e contração muscular; aumentando a captação de glicose através do recrutamento do GLUT4 ou através da regulação da expressão do gene *glut4* (GOODYEAR e KAHN, 1998). A ativação de AMPK no hepatócito inibe a síntese de ácidos graxos e colesterol pela inativação das enzimas, acetil Co-A carboxilase e

hidroximetilglutaril coA redutase (BEG *et al.*, 1973). Nas células pancreáticas a alta concentração de glicose diminui a atividade do AMPK (DA SILVA XAVIER *et al.*, 2000). Uma das ações do AMPK nas células beta pancreáticas seria diminuir a secreção de insulina (DA SILVA XAVIER *et al.*, 2003).

No hipotálamo o aumento da ativação de neurônios orexigênicos (AgRP) ativa AMPK (MINOKOSHI *et al.*, 2008). Hormônios periféricos anorexigênicos como leptina e insulina diminuem a atividade do AMPK no núcleo arqueado e no paraventricular, enquanto que a ghrelina é capaz de aumentar a atividade do AMPK (KAHN *et al.*, 2005). O estado nutricional modula a atividade do AMPK, o jejum ou a hipoglicemia aumenta sua atividade, enquanto que re-alimentação e a hiperglicemia diminuem a atividade do AMPK (KAHN *et al.*, 2005). Ou seja, o AMPK está relacionado com o balanço energético negativo da célula (KAHN *et al.*, 2005). Ambos os sensores funcionam como gatilhos para iniciar ou parar o processo de ingestão alimentar, através da modulação de peptídeos hipotalâmicos orexígenos e anorexígenos (COTA *et al.*, 2006; PIMENTEL *et al.*, 2013). O mTOR consequentemente induz a redução da ingestão de alimentos e por outro lado o AMPK induz o aumento do consumo (COTA *et al.*, 2006; PIMENTEL *et al.*, 2013).

Figura 2 - Apresentação de estímulos e da via sinalização celular dos sensores nutricionais AMPK e mTOR.

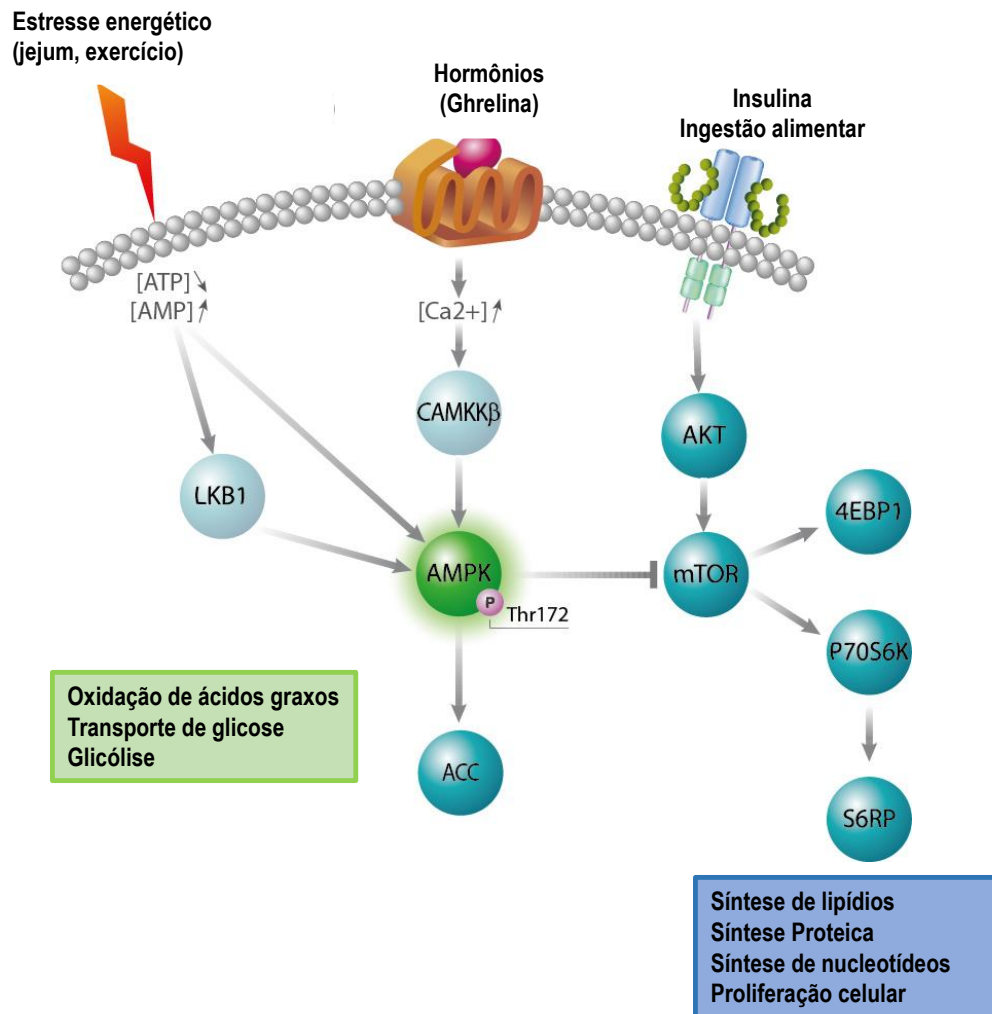


Figura retirada e adaptada do site: <http://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/phospho-ampk-thr172-total-ampk-cellular-assay-kits>.

Além do controle homeostático responsável pelos processos de fome e saciedade, existe no encéfalo o controle hedônico do comportamento alimentar (BERTHOUD, 2006). O controle hedônico é realizado pelo sistema de recompensa, que coordena a ingestão dos alimentos palatáveis ou *comfort foods* (GIBSON, 2012). Um alimento palatável é prazeroso e estimula de forma positiva o sistema gustatório (YAMAMOTO, 2008). As informações da palatabilidade são processadas em receptores distintos distribuídos nas papilas linguais. A informação de cada célula converge para o sistema nervoso central, onde serão gerados a

percepção cognitiva e os aspectos emocionais da informação palatável (YAMAMOTO, 2008). A integração dos estímulos palatáveis dos alimentos compete ao sistema de recompensa alimentar formado por diferentes estruturas encefálicas que compreendem, entre outras, a área tegmentar ventral, o núcleo accumbens, estriado, amígdala, hipocampo, ínsula, córtex órbito-frontal, hipotálamo lateral (KENNY, 2011) .

Cada estrutura do sistema de recompensa coordena de forma sincronizada a informação de palatabilidade do alimento, entre outras funções. A área tegmentar ventral e o núcleo accumbens são responsáveis pela regulação de aspectos motivacionais e propriedades de incentivo de alimento (FALLON *et al.*, 2007). O córtex órbito-frontal e amígdala codificam a informação relacionada com o valor de recompensa do alimento (BAXTER e MURRAY, 2002; KRINGELBACH *et al.*, 2003). A ínsula processa a informação relacionada ao paladar e seu valor hedônico (SMALL, 2010). O hipotálamo lateral seria o mediador entre o controle homeostático e hedônico em resposta a palatabilidade e o comportamento de busca do alimento (COONS *et al.*, 1965).

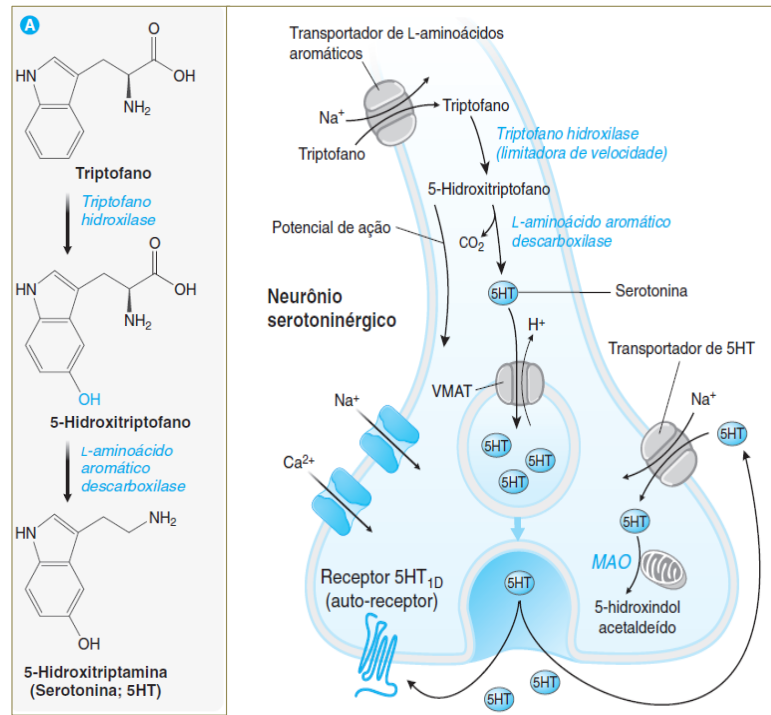
Embora haja uma divisão entre controle homeostático e não homeostático do comportamento alimentar, o tipo de alimento determina a via que será estimulada em detrimento a outra (BERTHOUD, 2006). A palatabilidade e as características organolépticas do alimento são preponderantes para estimular a via hedônica (sistema de recompensa), por outro lado o estado metabólico do indivíduo, jejum ou alimentado estimulam a via homeostática, prevalecendo assim o controle hipotalâmico (KELLEY *et al.*, 2005). Entretanto, foi visto que mesmo no estado alimentado, humanos são capazes de ingerir determinadas substâncias com base apenas no estímulo palatável ou resposta de recompensa (HAASE *et al.*, 2009). Podemos assim, inferir que um controle pode sobrepor um ao outro em resposta ao estímulo alimentar.

2.2 Serotonina e controle do comportamento alimentar homeostático

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido essencial triptofano. Sua síntese tem início quando o triptofano proveniente da dieta é convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através de uma hidroxilação no carbono 5 do anel aromático pela *triptofano hidroxilase*, enzima limitante para a síntese de serotonina (JORGENSEN, 2007). O 5-HTP é então descarboxilado por uma enzima descarboxilase inespecífica (*L-aminoácido aromático descaboxilase*) a 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina (Figura 3) (JORGENSEN, 2007). Após sua síntese, a serotonina é armazenada em vesículas através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) dentro das células produtoras e será liberada quando houver influxo de cálcio (despolarização da membrana) na célula (BORUE *et al.*, 2007). A principal rota de metabolização da serotonina é através da *enzima monoaminoxidase* (MAO), sendo a sua isoforma MAO-A, a principal responsável por essa degradação (HAMON M, 1982). A MAO-B representa apenas uma pequena parte e está localizada nas plaquetas. O principal metabólito da serotonina é o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que é excretado na urina (HAMON M, 1982). Após ser liberada na fenda sináptica depois da despolarização neuronal, a serotonina pode se ligar a um de seus receptores no neurônio pós-sináptico ou ao seu auto-receptor (5-HT_{1A/1D}) no neurônio pré-sináptico (LANFUMEY e HAMON, 2000). A ligação da serotonina ao seu auto-receptor bloqueia a liberação de serotonina na fenda sináptica através de um mecanismo de *feedback* negativo (LANFUMEY e HAMON, 2000). A proteína de recaptação de serotonina (SERT) pertence a uma classe de monoaminas transportadoras específicas (transportadores transmembrana sódio-dependentes) e está localizada no terminal pré-sináptico dos neurônios serotoninérgicos (SCHLOSS e WILLIAMS, 1998). A SERT é responsável pela remoção da serotonina da fenda sináptica (SCHLOSS e WILLIAMS, 1998).

Uma vez de volta ao neurônio, a serotonina é armazenada em vesículas pela VMAT para evitar sua degradação que ocorre no citosol neuronal pela MAO.

Figura 3 - Etapas da síntese e metabolismo da serotonina dentro de um neurônio serotoninérgico.

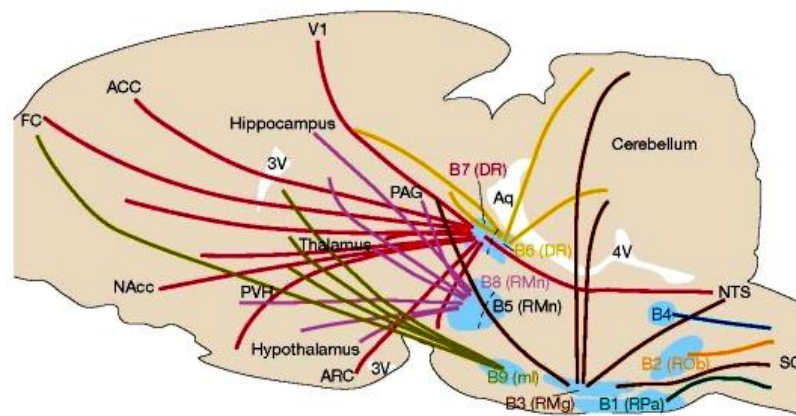


VMAT- transportador vesicular de monoaminas, MAO-monoaminoxidase. Figura retirada do livro *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia*, 2009.

Estruturalmente os neurônios serotoninérgicos se dispõem ao longo do tronco encefálico, denominados núcleos da rafe. O médico e histologista Ramón y Cajal em 1911 descreveu estruturas neuronais grandes, multipolares e de projeções indefinidas que formavam agregados na linha mediana do tronco encefálico e que apresentavam projeções axonais extensas (RAMON y CAJAL, 1911). Estudos citoarquitetônicos em gatos, algumas décadas depois, descreveram pela primeira vez os núcleos da rafe (TABER *et al.*, 1960). Esses núcleos são em número de oito, assim denominados no sentido rostro-caudal: núcleo linear rostral da rafe (RLi), linear caudal da rafe (CLi), dorsal da rafe (DR), mediano da rafe (MnR),

pontino da rafe (PnR), magno da rafe (MgR), pálido (Rpa) e obscuro da rafe (Rob) (TABER *et al.*, 1960; DAHLSTROEM e FUXE, 1964). Os grupos de neurônios de 5-HT foram classificados alfanumericamente, no sentido caudal-rostral, de B1-B9 em ratos (DAHLSTROEM e FUXE, 1964), podendo ser correlacionados com os núcleos da rafe (Figura 4).

Figura 4 - Representação das projeções encefálicas do sistema serotoninérgico em roedores, em corte sagital. A figura mostra fibras representativas indicando vias serotoninérgicas cerebrais do rato em diferentes cores.



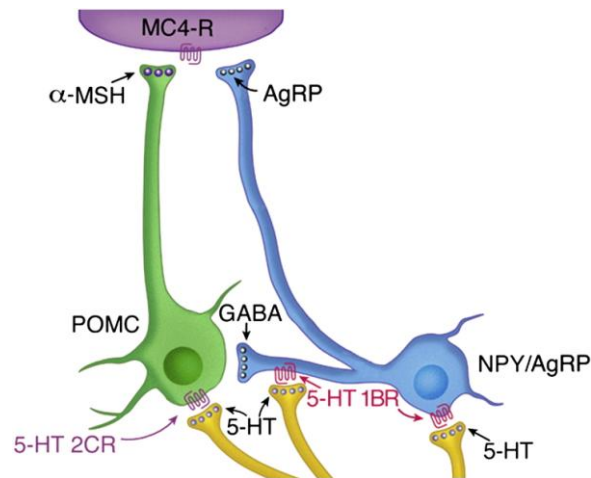
O grupo celular (B1-9) está representado nas áreas em azul. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; 4V, quarto ventrículo; ACC, córtex anterior cingulado; Aq, aqueduto; ARC, núcleo hipotalâmico arqueado; DR, núcleo dorsal da rafe; FC, córtex frontal; ml, leminisco medial; NAcc, núcleo accumbens; NTS, núcleo do trato solitário; PAG, substância cinzenta periaquedutal; PVH, núcleo hipotalâmico paraventricular; RMg, núcleo magno da rafe; RMn, núcleo mediano da rafe; Rob, núcleo obscuro da rafe; RPa, núcleo pálido da rafe; SC, medula espinhal; V1, córtex visual primário (Lam & Heisler, 2007).

Sobre o controle central do comportamento alimentar, o neurotransmissor serotonina atua no hipotálamo para desencadear a saciedade (BLUNDELL *et al.*, 1976; BLUNDELL e HILL, 1987; HALFORD *et al.*, 2005). A serotonina no hipotálamo exerce função na seleção de macronutrientes, no tamanho da refeição e no peso corporal (LEIBOWITZ *et al.*, 1989; LEIBOWITZ e ALEXANDER, 1998). Foi visto que a aplicação crônica de fluoxetina foi capaz de reduzir o consumo de proteína e lipídio mais não de carboidrato, mostrando a capacidade da via serotoninérgica na seleção dos macronutrientes (HEISLER *et al.*, 1997). Os níveis de serotonina nas sinapses são regulados via recaptação de

serotonina através da SERT, que a recolocam no interior do neurônio pré-sináptico (BORUE *et al.*, 2007). Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) atuam sobre a SERT aumentando a disponibilidade extracelular de 5-HT e potencializando a via serotoninérgica.

A serotonina apresenta 7 tipos (5-HT₁₋₇) e 14 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}) de receptores atualmente caracterizados (NICHOLS e NICHOLS, 2008). Os principais subtipos envolvidos no controle do comportamento alimentar no hipotálamo são o 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} (DOURISH *et al.*, 1989). Elevadas concentrações do receptor 5-HT_{1B} são encontradas nos núcleos hipotalâmicos paraventricular, ventromedial e arqueado, importantes áreas para o controle da ingestão alimentar (SIMANSKY e NICKLOUS, 2002). A administração do agonista seletivo 5-HT_{1B} (CP-94,253) reduz a ingestão alimentar e adianta o ponto de saciedade em ratos e camundongos (HALFORD e BLUNDELL, 1996; DE VRY e SCHREIBER, 2000; LEE *et al.*, 2002). Os receptores 5-HT_{2C} são expressos por todo o SNC e no hipotálamo se concentram no núcleo arqueado (WRIGHT *et al.*, 1995; HEISLER *et al.*, 2006). Quando aplica-se o agonista 5-HT_{2C} (RO-0175) ocorre redução do tamanho da refeição (CLIFTON *et al.*, 2000). Em importante estudo, verificou-se a localização e ação desses dois receptores no núcleo arqueado do hipotálamo sobre neurônios produtores de peptídeos orexigênicos (NPY e AgRP) e anorexigênicos (POMC e CART) (HEISLER *et al.*, 2006) (Figura 5). O receptor 5-HT_{1B} estar localizado no corpo de neurônios orexigênicos e em suas extensões inibitórias sobre os neurônios anorexigênicos (HEISLER *et al.*, 2006). Quando estimulado, o receptor 5-HT_{1B} hiperpolariza esses dois alvos inibindo a liberação de NPY e AgRP. Por outro lado, o receptor 5-HT_{2C} estar localizado no corpo de neurônios anorexigênicos. Sua estimulação promove despolarização neuronal e liberação de POMC e CART. Essa ação conjunta dos dois receptores 5-HT é um potente inibidor do consumo alimentar (HEISLER *et al.*, 2006).

Figura 5 - Representação esquemática dos sítios de ação da serotonina sobre a via das melanocortinas



Neuron, 2006 (51), 239-249.

2.3 Desenvolvimento do sistema nervoso central e mecanismos de controle da ingestão alimentar

A maturação do sistema de controle da ingestão alimentar pode se moldar em correspondência ao ambiente nutricional, direcionando, assim, o padrão maduro de controle do consumo e armazenamento de energia (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008; OROZCO-SOLIS *et al.*, 2010). Entre a nona e décima semana de gestação, no homem, ocorre o desenvolvimento do hipotálamo a partir da proliferação de células da zona germinal adjacente das paredes do III ventrículo (KOUTCHEROV *et al.*, 2003) e a partir da segunda metade da gestação (E16), no rato (HYYPPEA, 1969). Um dos primeiros núcleos a aparecer é o supraquiasmático (E17), o paraventricular (E18) e o arqueado diferencia-se no 1º dia pós-natal, embora sua estrutura surja assim como o ventromedial no 18º dia (18E) (HYYPPEA, 1969). Estudos anatômicos descrevem que a partir do segundo dia pós-natal o hipotálamo é capaz de expressar *c-Fos* (marcador de atividade neuronal) por estímulo de solução salina (BLUMBERG *et al.*, 2006). No entanto, a integração das vias hipotalâmicas de controle do

comportamento alimentar ainda não está estabelecida em toda sua complexidade ao nascimento (WELLER *et al.*, 1997). Estudos nesse tema têm investigado as respostas a sinais pós-ingestivos e sua integração com o hipotálamo para efetividade do controle do comportamento alimentar (HALL e BRUNO, 1984; WELLER *et al.*, 1997).

Com um dia de vida, o rato já é capaz de discriminar o que é reforço alimentar de apetite, pois mesmo com a imaturidade do encéfalo, o rato é capaz de condicionar-se aos odores aversivos e inibir a resposta de aprendizado alimentar (JOHANSON e HALL, 1979). Nos primeiros dias de vida, no rato, o principal mediador para saciedade e fome é a informação de enchimento ou esvaziamento gástrico, respectivamente (HOUPPT e EPSTEIN, 1973). Considerando que ratos têm período de lactação de vinte e um dias, a capacidade de regular a ingestão de solução de glicose a curto prazo apenas aparece aos seis dias de vida (HALL e BRUNO, 1984). Aos seis dias de vida, o experimento revelou que existe dois modos de controle de ingestão alimentar um a curto prazo baseado no nível de hidratação (*initial willingness*) e outro a longo prazo dependente de enchimento gástrico (*gastric filling*) (HALL e BRUNO, 1984). Aos doze dias de idade foi observado que pré-cargas de soluções hipertônicas de glicose e maltose reduzem a ingestão através de mecanismos pré-absortivos orosensoriais, gástricos e intestinais interferindo especialmente no tamanho da refeição (WELLER *et al.*, 1996). A resposta de saciedade ao consumo de lipídios ocorre a partir do décimo quinto dia de vida (WELLER *et al.*, 1997). Para a resposta a ingestão de lipídios é necessária à mediação de fibras vagais e liberação de CCK pelo intestino, o que ocorre por volta do 15º de lactação em ratos (WELLER *et al.*, 1997). Quanto à inibição de produtos derivados da digestão de proteínas (peptonas), mecanismos pós-ingestivos, aparecem entre 13º e 18º dia pós-natal (WELLER e TSITOLOVSKYA, 2004). O aparecimento relativamente tardio do controle da ingestão pós-natal pode ser consequência dos eventos ocorridos durante

o desenvolvimento do sistema nervoso que se inicia na gestação até o 35º dia de vida pós-natal do rato (MORGANE *et al.*, 1993).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os primeiros neurônios serotoninérgicos surgem a partir da quinta semana de gestação no encéfalo de humanos (SUNDSTROM *et al.*, 1993; LEVALLOIS *et al.*, 1997), apresentando sua organização típica nos núcleos da rafe por volta da décima quinta semana (TAKAHASHI *et al.*, 1986). Nos ratos, os primeiros neurônios serotoninérgicos aparecem entre o décimo e o décimo quarto dia da gestação (LAUDER e BLOOM, 1974). Recentemente foi descrito a presença dos componentes do sistema serotoninérgico na placenta, sendo esta a responsável pela presença de serotonina no encéfalo do feto antes do desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos (BONNIN *et al.*, 2011). O surgimento precoce dos neurônios serotoninérgicos e sua larga distribuição de terminais evidenciam a função essencial desempenhada por esse neurotransmissor no desenvolvimento e crescimento do encéfalo, sinaptogênese e sobrevivência celular (LAUDER e BLOOM, 1974; WHITAKER-AZMITIA, 2001; GASPAR *et al.*, 2003). Durante este período, os neurônios de 5-HT seguem diferentes vias migratórias para formar os vários núcleos da rafe no mesencéfalo, na ponte e na medula, emitindo projeções axonais originando os grupos de projeção ascendente e descendente de 5-HT, formando conexões sinápticas com os circuitos alvos (FOX e DENERIS, 2012). Os mecanismos de auto-regulação através dos auto-receptores 5-HT_{1A} e 5HT_{1B} estão presentes em neurônios serotoninérgicos no 14º dia gestacional na região rostral da rafe (HERY *et al.*, 1999). Além disso, o armazenamento e liberação de 5-HT foram detectados no 16º dia gestacional em projeções serotoninérgicas para o hipotálamo (UGRUMOV *et al.*, 1989)

A função da serotonina sobre o controle do comportamento alimentar no período neonatal inicial parece ser diferente daquele observado em indivíduos adultos (KIRSTEIN e

SPEAR, 1988). No entanto são escassas as informações a cerca desse fenômeno e, particularmente, da função que a serotonina pode exercer na maturação dos mecanismos de controle do comportamento alimentar. Durante o período de lactação, a serotonina parece exercer papel estimulador do comportamento de sucção até o nono dia de lactação (NOCK *et al.*, 1978). Após este período, a serotonina apresenta sua função de inibição do consumo alimentar favorecendo a transição entre aleitamento e ingestão de alimentos sólidos (KIRSTEIN e SPEAR, 1988; FRAMBES *et al.*, 1990; SPEAR *et al.*, 1991; SPEAR *et al.*, 1994; JACQZ-AIGRAIN e KOREN, 2005). Agonistas dos receptores 5-HT_{1A} reduzem a transmissão serotoninérgica e aumentam o consumo alimentar em ratos adultos (LOPEZ-ALONSO *et al.*, 2007). Esse agonista aumentou o consumo de leite em ratos pré-desmame (17-18 dias de vida), mas não em ratos recém-nascidos (3-4 dias de idade) (SPEAR *et al.*, 1991). Este estudo sugere que na idade de 3-4 dias, os auto-receptores 5-HT_{1A} ainda não estejam ativos para exercer sua função sobre o consumo de leite (SPEAR *et al.*, 1991).

Os agonistas dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT₂ apresentam também diferentes efeitos sobre o comportamento de sucção em ratos a depender do período de aleitamento (FRAMBES *et al.*, 1990). A utilização do mCPP (agonista de 5-HT_{1B}) aumenta *mouthing behavior*, ou seja a frequência de movimentos com os lábios na presença de leite, consequentemente aumenta a sucção (FRAMBES *et al.*, 1990). Este efeito com o agonista 5-HT₂ só é visto em neonatos, mas não em ratos pré-desmame (KIRSTEIN e SPEAR, 1988). Demonstrando que os receptores serotoninérgicos apresentam funções diferenciadas ao longo da maturação do comportamento de sucção. Portanto, os mecanismos subjacentes à maturação do comportamento alimentar via sistema serotoninérgico ainda permanecem pouco conhecidos.

2.4 Desnutrição Perinatal e Comportamento Alimentar

Desnutrição e má-nutrição são termos distintos (SHETTY, 2003). O termo desnutrição é usado para se referir geralmente à deficiência energética do estado nutricional, mas também pode implicar subalimentação, enquanto má-nutrição refere-se a todos os desvios do estado nutricional adequado e ideal, incluindo subnutrição energética e nutrição em excesso (obesidade é uma forma de má-nutrição) (SHETTY, 2003). A má-nutrição decorre da deficiência de nutrientes específicos ou de proporções inadequadas de alimentos, por exemplo, deficiências de vitaminas ou sais minerais (SHETTY, 2003).

A desnutrição é causada principalmente por uma ingestão inadequada de energia da dieta ou de macronutrientes específicos, independente de qualquer outro fator limitante, como por exemplo, a ausência de vitaminas e sais minerais (SHETTY, 2003). As causas comuns da desnutrição são: jejum prolongado, redução na disponibilidade de alimentos (causados por períodos de guerra, pobreza, fome ou conflitos); desordens intestinais (dificuldade de absorção de nutrientes, parasitose e infecções); patologias (doenças inflamatórias) (SHETTY, 2003).

A ocorrência de deficiências nutricionais no início da vida é relacionado com alterações morfofuncionais permanentes do organismo. Morgane e colaboradores (1993), propuseram o conceito de período crítico do sistema nervoso, afirmando que durante o desenvolvimento perinatal havia fases de maior vulnerabilidade a agressões com repercussões permanentes na vida adulta (MORGANE *et al.*, 1993). Estes períodos compreendem ao maior pico de desenvolvimento e crescimento encefálico, envolvendo processos como mielinização, neurogênese, diferenciação e migração neuronal (MORGANE *et al.*, 2002). Em ratos este período de vulnerabilidade compreende a gestação, lactação até por volta dos 35 dias de vida pós-natal do animal (MORGANE *et al.*, 2002).

A literatura é vasta quanto as diferentes repercussões da desnutrição perinatal sobre as funções encefálicas e consequente expressão do comportamento. Animais desnutridos apresentam atraso nos mecanismos de memória e aprendizado (VALADARES *et al.*, 2010), relacionados com alterações da estrutura do hipocampo assim como na proliferação de neurônios (LUKOYANOV e ANDRADE, 2000; MATOS *et al.*, 2011); retardo no aparecimento de reflexos e respostas motoras; alteração da maturação somática (BELLUSCIO *et al.*, 2014); hiporresponsividade à fármacos (BARRETO-MEDEIROS *et al.*, 2004); maior vulnerabilidade a ansiedade de depressão (BELLUSCIO *et al.*, 2014). Também apresentam modificações em diferentes níveis de controle do comportamento alimentar (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008).

Como falado anteriormente, o hipotálamo é a estrutura encefálica responsável pelo controle da ingestão de alimento e consequente balanço energético (MORTON *et al.*, 2006). Em animais submetidos à desnutrição foi observado retardo na resposta de saciedade na vida adulta (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2009). Estudos demonstram que a expressão de peptídeos hipotalâmicos está alterada nesses organismos. Foi visto que em condições pós-prandiais há diminuição da expressão de NPY e AgRP, seja o período de manipulação nutricional com restrição protéica a gestação ou perinatal (COUPE *et al.*, 2009). Mas não houve diferenças entre o estado de jejum e pós-prandial, sobre a expressão de POMC, em animais com dieta restrita na gestação (COUPE *et al.*, 2009). Quanto a expressão de CART reduziu no jejum, e aumentou no período de realimentação (COUPE *et al.*, 2009). Esses animais com restrição apenas na gestação não apresentaram retardo do ponto de saciedade nem aumento do tamanho da refeição (COUPE *et al.*, 2009). Em outro estudo com desnutrição perinatal foi visto que a expressão gênica no hipotálamo de peptídeos orexígenos (NPY e AgRP) aumenta aos 35 dias de vida, enquanto a expressão peptídeos anorexigênico (POMC) reduziu, mas não houve

modificação do CART (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2009). Neste trabalho também foi observado que os animais desnutridos apresentaram retardo no ponto de saciedade, e se apresentaram hiperfágicos com um padrão de circadiano alimentar alterado com aumento da ingestão alimentar, tanto durante o ciclo claro quanto no escuro (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2009). A restrição proteica durante o período perinatal também é capaz de modificar a expressão circadiana de peptídeos hipotalâmicos (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2011). A expressão de NPY se encontra em alta no ciclo claro e de AgRP, tanto no claro quanto no escuro (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2011). Enquanto que as expressões circadianas de POMC e CART estão em baixa nas duas fases do ciclo (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2011). Também foi analisado a expressão de dois genes-relógios no hipotálamo, o BMAL e o PER1, e nos animais desnutridos não foi detectado um ritmo padrão de expressão dos genes-relógios analisados (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2011). Estes genes relógios estão envolvidos na regulação de diferentes mecanismos metabólicos entre eles a síntese de glicose e lipídios (MAURY *et al.*, 2010).

A desnutrição também é capaz de modificar os níveis plasmáticos de substâncias liberadas por tecidos periféricos, assim como sua ação dentro do hipotálamo, repercutindo sobre a ingestão alimentar destes organismos (MANUEL-APOLINAR *et al.*, 2010). Os níveis plasmáticos de leptina estão aumentados, assim como o nível de expressão do receptor Ob-Rb em neurônios do hipotalâmicos (MANUEL-APOLINAR *et al.*, 2010). Mas alguns autores afirmam que haja deficiência ou redução da sensibilidade da leptina sobre seu receptor (MITCHELL *et al.*, 2009). O trato gastrointestinal libera peptídeos que sinalizam o estado energético do organismo (KONTUREK *et al.*, 2004). Foi visto que a restrição alimentar durante a primeira semana de gestação em ratos, foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos e a expressão gênica de ghrelina no estômago, tanto em animais com 1 dia pós-natal como na

vida adulta (NAGATA *et al.*, 2011). A expressão e os níveis plasmáticos de peptídeos anoréticos como PYY e CCK, aumentou nos neonatos mais reduziu na vida adulta (NAGATA *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem que a restrição alimentar em fases precoces da vida é capaz de alterar a expressão de peptídeos do TGI (NAGATA *et al.*, 2011). Da mesma forma, a desnutrição é capaz de aumentar os níveis de serotonina encefálica, da fração livre de L-triptofano, e níveis da triptofano hidroxilase (MANJARREZ *et al.*, 1988; MANJARREZ *et al.*, 2003). Embora haja aumento dos níveis do neurotransmissor, associado a isso ocorre hiporesponsividade do receptor 5-HT_{1B}, o que pode levar ao comprometimento na resposta de saciedade (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008).

Outras áreas encefálicas podem sofrer modificações pela desnutrição seja morfológicas ou funcionais. O núcleo do trato do trato solitário é um dos responsáveis pelo controle da duração e o tamanho da refeição, além de responder a sinais hormonais e mecânicos da periferia em estado de jejum ou alimentado (RINAMAN, 2010). Ao se avaliar o efeito da desnutrição perinatal sobre ativação de neurônios, no núcleo rostral e medial do NTS, foi observado que tanto aos 35 dias e 180 dias de vida, os animais desnutridos apresentaram maior ativação neuronal quando comparados ao grupo controle (LIRA *et al.*, 2014). Estes dados foram correlacionados ao retardo no disparo de saciedade, no aumento do tamanho e na duração da refeição dos animais desnutridos (LIRA *et al.*, 2014). Esses dados, nos revela a vulnerabilidade do NTS à desnutrição no início da vida com repercussões permanentes na vida adulta, o que pode comprometer permanentemente o padrão de ingestão alimentar.

Estes resultados, em conjunto, confirmam que a desnutrição ou restrição em períodos de vulnerabilidade do sistema nervoso comprometem diferentes níveis de controle do comportamento alimentar.

3 JUSTIFICATIVA

Os estudos em idades precoces são escassos quanto a análise da maturação do comportamento alimentar. Com base nos tópicos apresentados na revisão de literatura entendemos que a investigação da maturação do comportamento alimentar pode constituir ferramenta fundamental para o entendimento de como os eventos morfológicos e funcionais que circundam o controle da ingestão alimentar se desenvolvem para a consolidação de um padrão maduro. Outros pontos importantes foram a participação do sistema serotoninérgico e como a desnutrição afetam a consolidação desse processo. Portanto nosso estudo teve como objetivo avaliar o controle hipotalâmico e serotoninérgico do comportamento alimentar em ratos neonatos submetidos à desnutrição perinatal ou não.

4 HIPÓTESES

1) Ratos neonatos normonutridos apresentam maturação tardia dos sensores nutricionais mas respondem precocemente aos estímulos de fome e saciedade por ação dos peptídeos hipotalâmicos.

2) A ação do sistema serotoninérgico é determinante para a maturação dos mecanismos de saciedade no período de lactação e pode ser dessensibilizada em organismos com desnutrição.

5 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o controle hipotalâmico e serotoninérgico do comportamento alimentar em ratos neonatos submetidos à desnutrição perinatal ou não.

Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a expressão gênica dos sensores nutricionais AMPK/mTOR e dos neuropeptídeos NPY/AgRP e POMC/CART no hipotálamo de ratos neonatos normonutridos aos 10 e 18 dias de idade em resposta aos estímulos: jejum, carga gástrica não calórica ou leite.
- ✓ Analisar o efeito da desnutrição perinatal sobre o consumo de leite em resposta a fenfluramina nas idades de 10 e 18 dias de vida.
- ✓ Verificar os efeitos da desnutrição sobre a ativação neuronal nos núcleos hipotalâmicos e núcleos da rafe em resposta a fenfluramina nas idades de 10 e 18 dias de vida.

6 MÉTODOS

6.1 Animais

Todos os experimentos receberam aprovação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) nº do processo 23076.026104/2012-16 (UFPE). Foram utilizadas ratas albinas (200-250g de peso corporal) da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. A partir do diagnóstico as ratas prenhas foram transferidas para gaiolas individuais, e durante a gestação e lactação, no experimento 1: receberam dietas isocalóricas (normoprotéica com 17% de proteína, n=10). E para o experimento 2: foram utilizadas dietas com diferentes concentrações de proteína, dieta normoprotéica com 17% de proteína (n=8) ou dieta hipoprotéica com 8% de proteína (n=8). Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes por mãe, na proporção de 4:4 (macho:fêmea). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições padrão de biotério temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18 horas), recebendo ração e água *ad libitum*.

6.2 Experimento 1

Grupos Experimentais

As gestantes normonutridas (dieta 17% de proteína) deram origem às ninhadas que foram utilizadas para os experimentos aos 10 e 18 dias pós-natais, formados os grupos experimentais: Controle, Fasting, Gavage, Water e Milk segundo as manipulações: **Controle** - sem manipulação, n=5; **Fasting** – jejum de 6 horas (6:40 a.m - 12:40 p.m) , n=5; **Gavage** – gavagem sem introdução de conteúdo, n=5; **Water** – jejum mais gavagem de água , n=5;

Milk: jejum mais gavagem de leite artificial de rata (*Wombaroo* TM[®], Glen Osmond, South Australia), n=5. Cada grupo foi composto por no máximo 2 ratos de cada ninhada. Os animais durante o jejum ficaram em incubadora, com temperatura controlada de aproximadamente 33°C. As soluções administradas por gavagem corresponderam a 5% do peso corporal do animal. Após 20 minutos das manipulações, os animais foram decapitados, o hipotálamo removido e armazenado em -80°C para posteriores análises moleculares.

Análise de PCR-Quantitativo em tempo real

O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen e, logo após, a quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Depois, o RNA foi tratado com tampão de Wipeout gDNA (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42 °C e armazenado em gelo. Depois 2,0 ng de RNA purificado foram transcritos utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min e a enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos, no volume total de 20 µl em água livre de RNase. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20 °C até sua utilização. Logo após, 5 µl de cada amostra de cDNA diluído foram utilizados como fita molde (template) para a amplificação por PCR usando SYBRGreen (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) como corante e instrumento o termociclador: o Real-Time PCR - Rotor-Gene HRM 2Plex (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) como sistema de detecção. Parâmetros de PCR foram: inicialmente desnaturação de 5 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 95°C e 10s a 60°C. Os primers utilizados para a amplificação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Primers utilizados para análise de expressão gênica

Primers	Forward	Reverse
<i>ampk1a</i>	5'-TTGCGTGTGCGAAGGAAGAAC-3'	5'-TGGAGTAGCAGTCCCTGATTTGG-3'
<i>mtor</i>	5'-ACCAATTATACTCGCTCCCTG-3'	5'-CATAGCAACCTCAAAGCAGCT-3'
<i>npv</i>	5'-GTGGACTGACCCCTCTATC-3'	5'-ATGAGATTGATGTAGTGTTCGCAGAG-3'
<i>agrp</i>	5'-CGTGCTACTGCCGCT TCTTC-3'	5'-CCCTGCCTTTGCCCAACATC-3'
<i>cart</i>	5'-CCTACT GCTGCTGCTGCTACCTTTG-3'	5'-CCGAAGTTGCCGCCTTGG-3'
<i>Pomc</i>	5'-GAGGTAAAGGAGCAGTGACTAAGAG-3'	5'-GTAGCAGAATCT CGCCATCTTCC-3'
<i>β-actina</i>	5' -ACGGTCAGGTCATCACTATCG-3'	5' - CAGCACTGTGTTGGCATAGAG-3'

Os valores-limite de ciclo foram determinados a partir de parcelas de fluorescência normalizada versus o número de ciclos PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações de “primers” foram geradas traçando-se os valores médios do ciclo de limiar em função do logaritmo da quantidade de moléculas do molde alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de controle interno housekeeping (β -actina). A quantificação relativa de cada gene alvo foi analisada utilizando um método CT comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado para a referência endógena (β -actina): $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre o CT entre o gene de interesse e β -actina e para $\Delta\Delta CT = \text{média } \Delta CT \text{ da amostra} - \text{média } \Delta CT \text{ da amostra controle}$ (utilizada como calibração).

6.3 Experimento 2

Grupos Experimentais

A obtenção dos grupos experimentais foi realizada a partir das gestantes que receberam diferentes concentrações de proteína formando os grupos experimentais:

Controle (dieta normoprotéica com 17% de proteína), n=8 ou Desnutrido (dieta hipoprotéica com 8% de proteína), n= 8 (Tabela1). A partir da manipulação nutricional e farmacologia

aguda de fenfluramina (3 mg/Kg pc) ou de solução salina (NaCl 0.9%, s.c) foram formados os grupos experimentais: Controle-Salina (CS), Controle-Fenfluramina (CF), Desnutrido-Salina (DS), Desnutrido-Fenfluramina (DF). Cada grupo foi constituído por cinco animais provenientes de diferentes ninhadas (Diagrama 1).

Tabela 2- Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação.

Constituintes	Dieta hipoprotéica (8%)	Dieta normoprotéica (17%)
Proteínas	8,20	17,40
Carboidrato	64,80	55,00
Lipídios	7,00	7,00
Fibras	5,00	5,00
Vitaminas	1,00	1,00
Minerais	3,50	3,50
Metionina	0,30	0,30
Colina	0,25	0,25
BHT	0,0014	0,0014
% Kcal	362,48	363,44

Diagrama 1: Ilustração dos grupos experimentais



Procedimentos experimentais

Teste de ingestão alimentar:

Aos 10 e 18 dias de idade os filhotes foram separados das mães por um período de 4 horas e alocados em uma incubadora à 33°C. Em seguida, foi realizada estimulação através de fricção com uma haste flexível contendo algodão sobre a região genital dos filhotes para promover a excreção de urina e fezes.

Posteriormente, os animais foram pesados. Logo após, foi realizado teste de ingestão alimentar durante 30 minutos (HALL e BRUNO, 1984; BLUMBERG *et al.*, 2006). Nesse teste, os filhotes foram colocados em incubadora (33°C) sobre superfície embebida de leite (fórmula infantil - Nestlé®). O consumo de leite foi obtido pela diferença entre o peso corporal anterior e posterior ao teste seguindo a fórmula $[(\text{peso final} - \text{peso inicial}) * 100] - 100$. Para testar os efeitos da fenfluramina sobre o consumo alimentar dos animais, controles ou desnutridos, este fármaco foi aplicado 30 minutos antes do teste, por via subcutânea.

Atividade neuronal em resposta ao consumo de leite ou fenfluramina:

Os estímulos para análise da ativação neuronal foram realizados aos 10 e 18 dias de idade. Sessenta minutos antes da perfusão, os animais foram submetidos às seguintes condições: injeção de solução salina (NaCl 0.9%, s.c) e exposição ao leite ou injeção aguda de fenfluramina (3 mg/Kg pc) e leite. Inicialmente, os animais receberam aplicação aguda de fenfluramina ou salina 30 minutos antes da oferta de leite em superfície embebida durante mais 30 minutos, posteriormente foram direcionados para perfusão.

Perfusão Transcardíaca em ratos neonatos de 10 e 18 dias de vida

Os animais foram perfundidos transcardiacamente após serem anestesiados profundamente com Cloridrato de Ketamina (Dopalen-Ceva®, Paulínia-São Paulo, Brasil, 1ml/Kg de p.c.) e Cloridrato de Xilazina (Anasedan – Ceva® Paulínia-São Paulo, Brasil, 0,10 ml/Kg de p.c.), por via intramuscular. Para a perfusão, foi aberta a cavidade torácica para obter acesso ao coração (NOGUEIRA *et al.*, 1997). Em seguida, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica (Milan® BP-600, Colombo, Paraná-PR, Brasil) e introduzida no ventrículo esquerdo do coração. A bomba foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foi infundida 150ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente para remoção do sangue dentro dos vasos. A perfusão com salina foi seguida com a infusão de solução fixadora (4% de paraformaldeído, pH 7,4; a 4° C).

Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio, e pós-fixados na mesma solução fixadora mais sacarose (20%) durante 4 horas. Após esse período, foi armazenado em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio – PBS - mais sacarose 20%) por 6-24 h.

Imunohistoquímica contra a proteína Fos

Os cortes de uma série, contendo os núcleos da rafe e os núcleos hipotalâmicos foram processados para imunohistoquímica contra proteína c-Fos pelo *Método da Peroxidase-DAB*. Para isso, após lavagens sucessivas com solução tampão de fosfato de sódio, os cortes foram incubados com anticorpo primário (anti-c-fos (4) sc-52, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA) sob a diluição de 1:200 por 48 horas, em câmara refrigerada a 4° C. Posteriormente, foram incubados em anticorpo secundário biotinilado (B8895-Anti-Rabbit IgG-Biotin antibody produced in goat, Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, USA) sob

diluição 1:800 por 90 min, em camara refrigerada a 4°C. Após amplificação do sinal com o Complexo Avidina-Biotina (Kit Vectastain P-4000, Vector Laboratories®, California, USA) com incubação por 90 min, a revelação foi realizada com solução de 3,3 Diaminobenzidina (DAB- Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, USA) diluído em H₂O com cloreto de amonio, beta D-glicose e NAS (Sulfato de Niquel (II) hexahidratado e Acetato de Sódio, Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, USA), posteriormente a reação foi ativada com glicose oxidase (Glucose oxidase from *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, USA), até o aparecimento da coloração negra nos neurônios ativados pela c-Fos.

Contagem dos Neurônios imunorreativos a proteína Fos

Os cortes foram montados em lâmina e lamínula fixada com Entellan®-Merck-Millipore (Darmstadt, Alemanha), seguindo o Atlas *The Rat in Stereotaxic Coordinates Paxinos & Watson* (6ª edição, Elsevier). As imagens das lâminas foram capturadas, com auxílio de Microscópio Óptico e Sistema de Captação de Imagem (Axio Imager 2 Zeiss™, Monique-Alemanha; com a objetiva de 10x). Todas as células com marcação negra evidente foram contadas, nas regiões selecionadas, através do Programa Image Pro® Plus Versão 6.0 para Windows (Silver Spring, Maryland, USA).

As regiões selecionadas estão localizadas a partir das seguintes faixas de Bregma:
Para o hipotálamo: N. Arqueado (-1.80mm ao -3.48mm); N. Paraventricular (-1.80mm ao -2.28mm), N. Ventromedial (-1.80mm ao -3.36mm); N. Dorsomedial (-2.40mm ao -3.60mm); Para os *núcleos da rafe* foram selecionados o mediano (-7.08mm ao -8.64mm) e dorsal (-6,96mm ao -8.09mm).

6.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM. Para o experimento 1: os dados paramétricos foram avaliados através do Two Way RM ANOVA ou One Way ANOVA. Quando detectada diferença pela ANOVA, foi utilizado pós-teste de Bonferroni ou pós-teste de Tukey, respectivamente. No experimento 2: Para comparação do percentual do ganho de peso e o número de células c-fos positivas foi utilizado o teste ANOVA One Way, seguido do pós-teste Bonferroni para avaliação da ativação de células imunorreativas a proteína FOS ou Tukey para o percentual de ganho de peso. Para fins estatísticos em todas as comparações foi considerada a significância de $p < 0,05$. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0 versão 7 (<http://www.graphpad.com>).

7 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados na forma de dois artigos originais: O primeiro submetido ao periódico **Developmental Neuroscience** (Qualis A2), com o título: “*Hypothalamic peptide and nutrient sensors gene expression in the hypothalamus of neonatal rat*”. E o segundo artigo original submetido ao periódico **Physiology & Behavior** (Qualis A2), intitulado “*Effects of perinatal protein malnutrition and fenfluramine action on food intake and neuronal activation in the hypothalamus and raphe nuclei of neonate rat*”.

7.1 Artigo 1

EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS HIPOTALÂMICOS E SENSORES NUTRICIONAIS NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NEONATOS

INTRODUÇÃO

O controle do comportamento alimentar envolve a integração de sinais periféricos, particularmente do trato gastrointestinal e tecido adiposo, com estruturas do sistema nervoso central (PARKER e BLOOM, 2012). São diversas as vias e substâncias envolvidas neste processo que visa à manutenção do balanço energético do organismo (BERTHOUD, 2011). O hipotálamo é o principal receptor de informações periféricas participando do controle homeostático do comportamento alimentar. São utilizadas diferentes populações neuronais, peptídeos e sensores nutricionais neste controle (PARKER e BLOOM, 2012). Algumas populações de neurônios hipotalâmicos envolvidos no controle do comportamento alimentar homeostático expressam peptídeos orexigênicos como o Neuropeptídio Y (NPY) e a proteína relacionada ao gene agouti (AgRP) e anorexigênicos como a Proopiomelanocortina (POMC) e Transcrito relacionado a cocaína anfetamina (CART) (FUKUSHIMA *et al.*, 2015). Nesses neurônios também encontramos os sensores nutricionais AMPK e mTOR, que detectam os diferentes níveis de estados energético celular. O AMPK é ativado em resposta a depleção de energia intracelular, enquanto o mTOR responde ao aumento de energia na célula (HAY e SONENBERG, 2004; HUE e RIDER, 2007). Nos núcleos hipotalâmicos, o AMPK está co-localizado com NPY/AgRP e o mTOR com NPY/AgRP e também com POMC (CLARET *et al.*, 2007).

No rato neonato, o principal mediador para saciedade ou fome é a informação de distensão ou contração gástrica, respectivamente (HOUPY e EPSTEIN, 1973). Considerando que ratos têm período de lactação de vinte e um dias, a capacidade de regular a ingestão de

solução de glicose a curto prazo apenas aparece aos seis dias de vida (HALL e BRUNO, 1984). Nesta idade, foi observado que existem dois tipos de controle de ingestão alimentar, um a curto prazo, baseado no nível de hidratação (*initial willingness*) e outro a longo prazo, dependente do estiramento gástrico (*gastric filling*) (HALL e BRUNO, 1984). No entanto, a integração central dos mecanismos de controle do comportamento alimentar ainda não está estabelecida em toda sua complexidade ao nascimento (WELLER *et al.*, 1997). Estudos nesse tema têm investigado as respostas a sinais pós-ingestivos e sua integração com o hipotálamo para efetividade do controle do comportamento alimentar (HALL e BRUNO, 1984; WELLER *et al.*, 1997). O presente estudo objetivou estudar a expressão de sinalizadores celulares do controle do comportamento alimentar em hipotálamo de ratos neonatos. Serão analisados a expressão gênica de sensores nutricionais AMPK/mTOR e dos peptídeos NPY/AgRP e POMC/CART.

OBJETIVO

Geral

Avaliar os a maturação dos sensores AMPK/mTOR e dos neuropeptídeos NPY/AgRP e POMC/CART em hipotálamo de ratos neonatos normonutridos.

Específicos

- ✓ Avaliar a expressão gênica dos sensores AMPK/mTOR e dos neuropeptídeos NPY/AgRP e POMC/CART

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Grupos Experimentais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Centro de Comitê de Ética de Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (processo nº 23076.026104/2012-16), seguindo e as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), mantidos em temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com ciclo claro/escuro (claro 6:00 a.m - 6:00 p.m), com água e ração *ad libitum*. Para obtenção dos animais, ratas foram acasaladas. Confirmada a gestação através da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, as gestantes foram transferidas para gaiolas individuais. No primeiro dia pós-natal, a ninhada foi ajustada para oito filhotes. Aos 10 e 18 dias pós-natais, foram formados os grupos experimentais Controle, Fasting, Gavage, Water e Milk segundo as manipulações: **Controle** - sem manipulação, n=5 ; **Fasting** – jejum de 6 horas (6:40 a.m - 12:40 p.m), n=5; **Gavage** – gavagem sem introdução de conteúdo, n=5; **Water** – jejum mais gavagem de água, n=5; **Milk**: jejum mais gavagem de leite artificial de rata (*Wombaroo* TM[®], Glen Osmond, South Australia), n=5. Cada grupo foi composto por no máximo 2 ratos de cada ninhada. As soluções administradas por gavagem corresponderam a 5% do peso corporal do animal. Após 20 minutos das manipulações, os animais foram decapitados, o hipotálamo removido e armazenado em -80°C para posteriores análises moleculares.

Análise de PCR-Quantitativo em tempo real

O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen e, logo após, a quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Depois, o RNA foi tratado com tampão de Wipeout gDNA (Qiagen ®, Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42 °C e armazenado em gelo. Depois 2,0 ng de RNA purificado foram transcritos utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen ®, Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min e a enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos, no volume total de 20 µl em água livre de RNase. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20 °C até sua utilização. Logo após, 5 µl de cada amostra de cDNA diluído foram utilizados como fita molde (template) para a amplificação por PCR usando SYBRGreen (Qiagen ®, Hilden, Alemanha) como corante e instrumento o termociclador: o Real-Time PCR - Rotor-Gene HRM 2Plex (Qiagen ®, Hilden, Alemanha) como sistema de detecção. Parâmetros de PCR foram: inicialmente desnaturação de 5 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 95°C e 10 s a 60°C. Os primers utilizados para a amplificação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Primers utilizados para análise da expressão gênica

Primers	Forward	Reverse
<i>ampk1a</i>	5'-TTGCGTGTGCGAAGGAAGAAG-3'	5'-TGGAGTAGCAGTCCCTGATTG-3'
<i>mtor</i>	5'-ACCAATTATACTCGCTCCCTG-3'	5'-CATAGCAACCTCAAAGCAGCT-3'
<i>npv</i>	5'-GTGGACTGACCCCTCTATC-3'	5'-ATGAGATTGATGTAGTGTCGCAGAG-3'
<i>agrp</i>	5'-CGTGCTACTGCCGCT TCTTC-3'	5'-CCCTGCCTTTGCCCAACATC-3'
<i>cart</i>	5'-CCTACT GCTGCTGCTGCTACCTTTG-3'	5'-CCGAAGTTGCCGCCTTGG-3'
<i>Pomc</i>	5'-GAGGTTAAGGAGCAGTACTAAGAG-3'	5'-GTAGCAGAATCT CGCCATCTTCC-3'
<i>β-actina</i>	5' -ACGGTCAGGTCATCACTATCG-3'	5' - CAGCACTGTGTTGGCATAGAG-3'

Os valores-limite de ciclo foram determinados a partir de parcelas de fluorescência normalizada versus o número de ciclos PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações de “primers” foram geradas traçando-se os valores médios do ciclo de limiar em função do logaritmo da quantidade de moléculas do molde alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de controle interno *housekeeping* (β -actina). A quantificação relativa de cada gene alvo foi analisada utilizando um método CT comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado para a referência endógena (β -actina): $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre o CT entre o gene de interesse e β -actina e para $\Delta\Delta CT = \text{média } \Delta CT \text{ da amostra} - \text{média } \Delta CT \text{ da amostra controle}$ (utilizada como calibração).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM. Os dados paramétricos foram avaliados através da Análise de Variância, Two Way RM ANOVA ou One Way ANOVA. Quando detectada diferença pela ANOVA, foi utilizado pós-teste de Bonferroni ou pós-teste de Tukey, respectivamente. Para fins estatísticos em todas as comparações foi considerada a significância de $p < 0,05$. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0 versão 7.

RESULTADOS

Efeitos do jejum sobre a expressão gênica de AMPK α 1, mTOR, NPY, AgRP, POMC e CART.

Para determinar os efeitos do jejum sobre a expressão gênica, avaliamos os grupos *Control* e *fasting*. Foi observado efeito do jejum sobre a expressão dos sensores nutricionais AMPK α 1 (Figura 1A) e mTOR (Figura 1B) nas idades de 10 e 18 dias. Observamos aumento na expressão de AMPK α 1 no 10 (C=11,39 $\pm$ 1,17; J=16,79 $\pm$ 1,01; p=0,0174) e 18 dias de vida (C=14,82 $\pm$ 0,94; J=24,87 $\pm$ 1,12; p=0,001) após jejum. Por outro lado, o jejum promoveu redução na expressão de mTOR hipotalâmico no 10 (C=48,74 $\pm$ 4,21; J=37,50 $\pm$ 2,67; p=0,036) e 18 dias de vida (C=27,99 $\pm$ 1,37; J=16,06 $\pm$ 0,70, p=0,007).

O jejum promoveu efeito sobre a expressão do NPY (Figura 1C), do AgRP (Figura 1D) e do POMC apenas no 18 dia de vida (Figura 1F). Não houve efeito do jejum sobre a expressão do CART (Figura 1E). O jejum promoveu, apenas aos 18 dias de vida, aumento na expressão de NPY (C=16,41 $\pm$ 1,99; J=25,58 $\pm$ 3,93; p=0,041), AgRP (C=0,87 $\pm$ 0,21; J=2,38 $\pm$ 0,58; p=0,049) e POMC (C=0,75 $\pm$ 0,14; J=2,89 $\pm$ 0,20; p=0,0009).

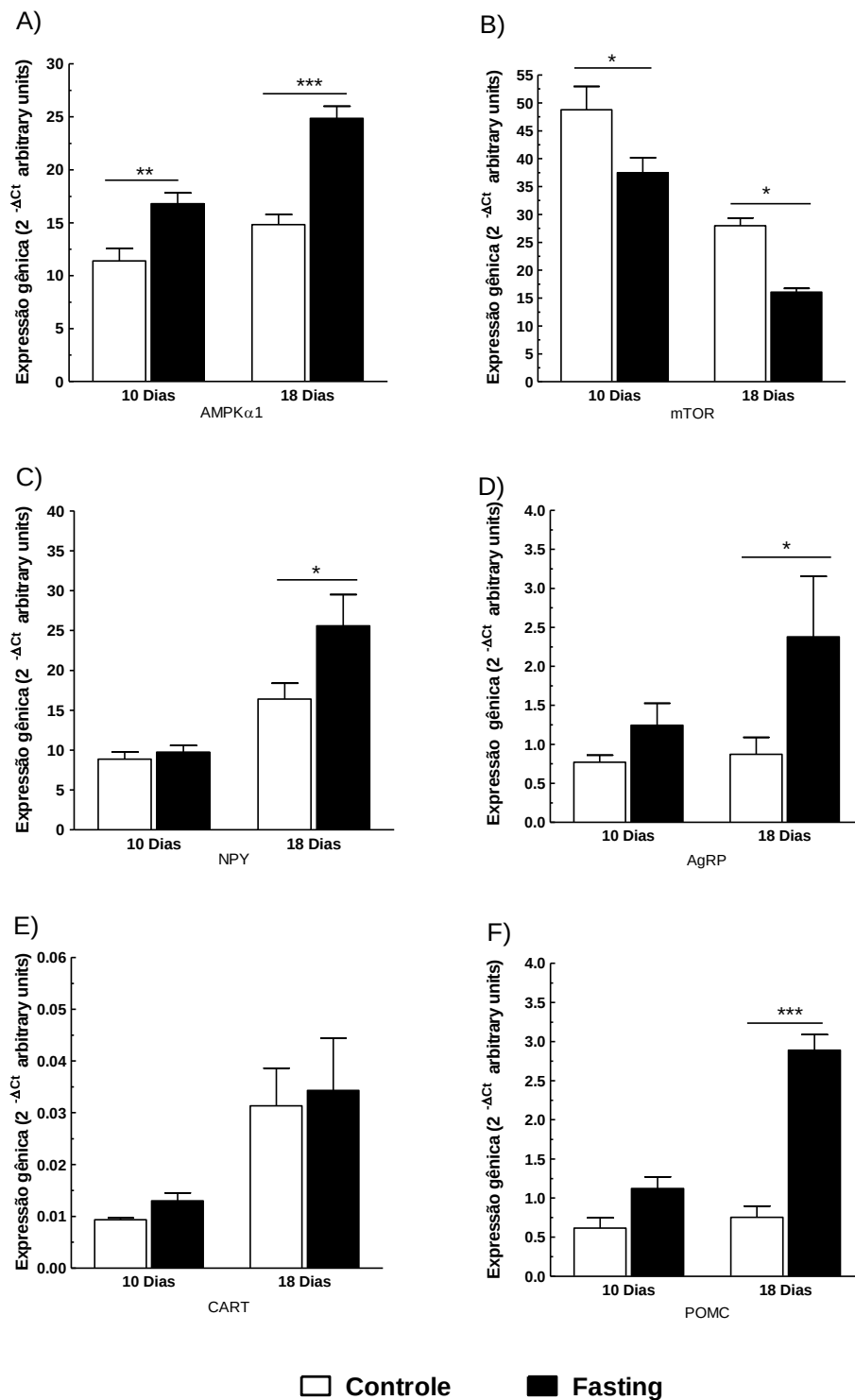


Figura 1 - Efeito do jejum sobre a expressão gênica de sensores nutricionais e peptídeos hipotalâmicos. Foi avaliada a expressão gênica dos sensores nutricionais, proteína quinase 5' adenosina monofosfato ativada- AMPK α 1 (A), proteína alvo da rapamicina em mamíferos mTOR (B), e do neuropeptídeo Y - NPY (C), proteína relacionada ao gene *agouti* -AgRP (D), transcrito relacionado a cocaína e anfetamina- CART (E) e proopiomelanocortina- POMC (F) aos P10 e P18 dias de vida pós-natal. Os dados correspondem a mean $\pm$ SEM. One-way ANOVA seguindo de Turkey test. * p<0.05 e *** p<0.001.

Efeitos da carga calórica ou não sobre a expressão gênica de AMPK α 1, mTOR, NPY, AgRP, POMC e CART.

Houve efeito da administração de água ou leite sobre a expressão de sensores nutricionais ou de peptídeos hipotalâmicos aos 10 e aos 18 dias de idade.

A administração de leite ou água promoveu aumento na expressão gênica do AMPK α 1 aos 10 (G=10,56 $\pm$ 1,12; W=15,80 $\pm$ 0,81; M=16,52 $\pm$ 2,59, p<0,094) ou 18 dias de idade (G=7,08 $\pm$ 0,55; W=12,86 $\pm$ 2,92; M=14,89 $\pm$ 1,08; p<0,0004) comparado ao grupo gavage (Figura 2A).

Na expressão gênica de mTOR verificou-se, na oferta de água e de leite, aumento aos 18 dias (G=13,61 $\pm$ 0,55; W=26,82 $\pm$ 3,56; M=21,30 $\pm$ 2,56; p<0,0005) quando comparados ao grupo gavage (Figura 2B).

A expressão gênica de NPY não foi modificada com administração de leite ou água aos 10 dias de vida, no entanto, aos 18 dias verificou-se aumento na sua expressão com o estímulo da água comparado ao gavage e redução com o leite comparado ao água (G=11,04 $\pm$ 1,62; W=20,82 $\pm$ 1,38; M=13,22 $\pm$ 0,16; p<0,0002) (Figura 2C). Diferente do NPY, a expressão gênica hipotalâmica de AgRP aumentou (G=5,87 $\pm$ 1,20; W=7,72 $\pm$ 1,02; M=17,49 $\pm$ 2,12; p<0,002) em resposta a cargas de leite ou água aos 10 dias de vida comparado ao grupo gavage (Figure 2D). Aos 18 dias de vida, foi observada maior expressão de AgRP no grupo água comparado ao grupo leite e ao gavage (G=16,04 $\pm$ 1,73; W=25,08 $\pm$ 3,90; M=11,75 $\pm$ 3,0, p<0,0044) (Figure 2D).

Quanto aos peptídeos hipotalâmicos anorexigênicos, observamos aumento aos 10 dias da expressão de CART nos grupos água e leite comparado ao gavage (G=9,61 $\pm$ 0,88; W=10,66 $\pm$ 1,84; M=17,58 $\pm$ 2,31, p<0,003) (Figure 2E). Não houve diferença nos níveis de CART aos 18 dias de vida em todos os grupos observados (Figure 2E). Resultados diferentes foram observados para POMC, com o grupo água apresentando maior expressão gênica aos

10 dias comparado ao grupo gavage ($G=4,15 \pm 0,27$; $W=7,92 \pm 1,36$; $M=6,20 \pm 1,05$; $p<0,010$) e aos 18 dias comparado ao grupo gavage e ao grupo leite ($G=9,72 \pm 2,44$; $W=31,31 \pm 4,02$; $M=15,76 \pm 2,54$, $p<0,004$) (Figura 2F).

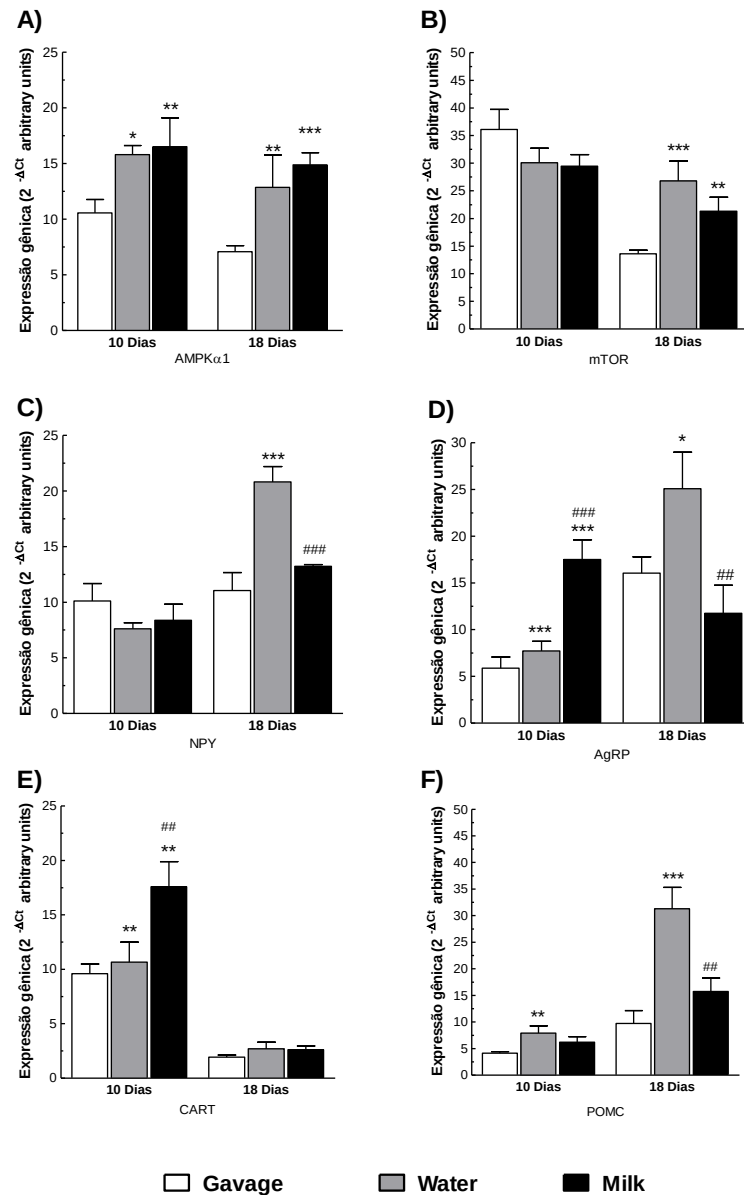


Figura. 2 – Efeito de carga calórica e não sobre a expressão gênica de sensores nutricionais e peptídeos hipotalâmicos. Foi avaliada a expressão gênica dos sensores nutricionais: proteína quinase 5' adenosina monofosfato ativada- AMPKα1 (A), proteína alvo da rapamicina em mamíferos-mTOR (B), e dos neuropeptídeos hipotalâmicos: neuropeptídeo Y - NPY (C), proteína relacionado ao gene *agouti*-AgRP (D), transcrito relacionado a anfetamina e cocaína-CART (E) e proopiomelanocortina-POMC (F) aos P10 e P18 dias de vida pós-natal. Os dados correspondem a mean±SEM. Two-way ANOVA seguindo de Bonferroni test. * $P<0,05$; ** $P<0,001$ e *** $P<0,000$, comparado com Gavage; # Comparado com Water.

DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a expressão gênica dos sensores nutricionais e peptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle do comportamento alimentar em ratos neonatos. A análise foi realizada em idade na qual há imaturidade no controle do consumo alimentar, aos 10 dias, e quando há ingestão independente, aos 18 dias de idade. Utilizamos como estímulos o jejum e a distensão gástrica calórica ou não. Sabemos que os sensores nutricionais e peptídeos hipotalâmicos analisados respondem de formas diferentes a tais estímulos, o que nos permitiu verificar se o padrão observado no adulto já está presente em idades precoces. No rato, em idade precoce, fatores pré-absortivos prevalecem sobre os pós-absortivos (WELLER *et al.*, 2000). Após o 15º dia de vida do rato inicia-se a preparação para o desmame, com declínio do consumo de leite e aumento no consumo de alimento sólido (HALL e ROSENBLATT, 1978). As alterações comportamentais são acompanhadas de ajustes nos mecanismos de controle do consumo alimentar (HALL e ROSENBLATT, 1978). Através da ativação de mecanorreceptores gástricos, o nervo vago envia informações ao núcleo do trato solitário (NTS), no tronco encefálico, que irá influenciar o início ou término da refeição. Do NTS as informações seguem principalmente para o hipotálamo onde poderá ativar ou inibir peptídeos orexigênicos ou anorexigênicos. Assim, ao analisar a expressão de peptídeos hipotalâmicos e sensores nutricionais no hipotálamo em resposta a jejum, carga calórica ou apenas distensão gástrica, poderemos traçar uma visão integrativa de diferentes fatores envolvidos no controle do comportamento alimentar durante o período de desenvolvimento de tal sistema. Vale salientar que este é o primeiro estudo com este objetivo. Em resumo, os dados do nosso estudo indicam que o AMPK responde precocemente a estímulos alimentares enquanto o mTOR parece apresentar padrão adulto apenas em idade tardia. Padrões distintos de expressão também foram observados para os peptídeos

hipotalâmicos. O jejum não foi efetivo em modificar a expressão de nenhum peptídeo em idade precoce, porém verificamos respostas do AgRP, CART e POMC as cargas calóricas ou não aos 10 dias. Apenas o NPY não apresenta resposta em idade precoce.

Observamos que o jejum induz aumento da expressão gênica de AMPK independente da idade analisada. Sabendo-se que a depleção de ATP é um dos principais sinais celulares responsáveis pela ativação do AMPK (HARDIE e CARLING, 1997; MINOKOSHI *et al.*, 2004), podemos sugerir que a ação desse sensor no estado de jejum já é efetiva em idades precoces. Por outro lado, a expressão do AMPK hipotalâmico também respondeu a distensão gástrica, calórica ou não, em ambas as idades. Sabe-se que o jejum ativa AMPK e a realimentação reprime, esse resultado corrobora que a ação desse sensor a curto prazo não está bem definida (MINOKOSHI *et al.*, 2008). No entanto, sabemos que o controle a longo prazo, em neonatos, envolve o *gastric filling* que envia informações via nervo vago ao núcleo do trato solitário (HALL e BRUNO, 1984; CAVANAUGH *et al.*, 2015). A distensão gástrica estimula a liberação de ghrelina pelo estômago que por sua vez ativa AMPK no hipotálamo (CARLING, 2005). Essa pode ser a via pela qual estímulos de carga energética e distensão do estômago podem aumentar a expressão de AMPK. O consumo de leite também promove liberação de fatores anorexigênicos, como a colecistocinina e a leptina (LUPOLI *et al.*, 2001). Na vida adulta, sabe-se que estas substâncias anorexigênicas inibem a ativação de AMPK no hipotálamo (AKIEDA-ASAI *et al.*, 2014). Ao verificarmos que em ratos neonatos carga gástrica aumentou a expressão gênica de AMPK, podemos inferir que a ação hipotalâmica do AMPK é mais influenciada em períodos precoces da vida por informações de enchimento gástrico, e menos por hormônios periféricos anorexigênicos.

O outro sensor nutricional analisado, mTOR, sinaliza disponibilidade de nutrientes, regulando o balanço energético positivo (COTA *et al.*, 2006). O estado de jejum em ratos

neonatos promoveu redução na expressão de mTOR independente da idade. Isto demonstra maturidade deste sistema em idades precoces da vida. Quando analisado em resposta a cargas gástricas, energéticas ou não, o mTOR responde com aumento na sua expressão no hipotálamo apenas ao 18 dia de vida. Este achado pode ter ocorrido possivelmente por imaturidade de vias que detectam variações de energia na célula. Em estudos com neonatos, foi verificado que a capacidade da glicose induzir resposta hipotalâmica é controversa, podendo ocorrer entre o 6º ou 12º dia de vida pós-natal (HALL e BRUNO, 1984; WELLER *et al.*, 1996). Para a resposta a ingestão de lipídios é necessária à mediação de fibras vagais e liberação de CCK pelo intestino, o que ocorre por volta do 15º de lactação em ratos (WELLER *et al.*, 1997). Para produtos derivados da digestão de proteínas (peptonas), a respostas aparecem entre 13º e 18º dia pós-natal (WELLER e TSITOLOVSKYA, 2004). Os sensores nutricionais são capazes de influenciar na atividade do outro, jejum e o baixo nível de energia celular levam a ativação do AMPK que é capaz de inibir o mTOR (COTA *et al.*, 2007). Nossos dados, com neonatos, sugerem que a resposta a longo prazo, por estímulo do jejum, segue o padrão de animais adultos. No entanto, a curto prazo, com distensão gástrica, energética ou não, a expressão gênica dos sensores nutricionais analisados não apresenta padrão de maturidade ainda bem definido.

O jejum e carga gástrica não calórica induziram aumento na expressão gênica dos neuropeptídeos orexigênicos, NPY e AgRP no 18 dia de vida. Na vida adulta, o jejum induz a elevação de 5 a 10 vezes na expressão de NPY e de AgRP no hipotálamo (BECK *et al.*, 1992). O jejum aumenta a imunoreatividade (SAHU *et al.*, 1988) e liberação (SAHU *et al.*, 1988) de NPY no núcleo paraventricular do hipotálamo. Nossos resultados indicam que a resposta hipotalâmica do NPY e AgRP ao jejum apresenta o padrão adulto aos 18 dias de vida, mas não aos 10 dias. Em ratos jovens a ingestão após período de jejum é modulada por

sinais de hidratação, e não por sinais calóricos ou metabólicos (PHIFER *et al.*, 1991). Sugerimos que essa diferente via de modulação, pode ser responsável pela não alteração observada em animais de 10 dias. Por outro lado, sabemos que a leptina tem importante papel no efeito do jejum sobre os níveis de NPY no hipotálamo, mas em idades precoces ela apresenta efeito diferente sobre os neuropeptídeos (PROULX *et al.*, 2002). Contrário ao que observamos, estudo com ratos Zucker (geneticamente obeso), mostram aumento no NPY no núcleo arqueado em resposta ao jejum nos dias 2, 9, 12 e 15 de vida (KOWALSKI *et al.*, 1998). Esses resultados indicam resposta do NPY em idade precoce, no entanto diferente do nosso estudo por avaliar o núcleo arqueado isoladamente, enquanto avaliamos o hipotálamo completo.

Em relação a carga gástrica não calórica, observamos aumento na expressão de NPY e AgRP aos 18 dias. Antes de 12 dias de vida as respostas ao consumo de leite são predominantemente pré-prandiais, gerados por mecanorreceptores gástricos (WELLER *et al.*, 2000). Quando receberam carga calórica de glicose ou manitol (substância não absorvida) ratos menores que 12 dias respondem igualmente com redução de consumo (WELLER *et al.*, 2000). Por outro lado, o conteúdo calórico da carga gástrica inibiu o aumento dos peptídeos orexigênicos observados com carga não calórica aos 18 dias. Outro estudo observou que a realimentação, após jejum, promove retorno dos níveis basais de NPY e AgRP (SAHU *et al.*, 1988). Sabemos que os nutrientes podem estimular a liberação de substâncias anorexígenas periféricas, entre elas a leptina, a colecistocinina, o GLP-1, entre outros, que podem inibir a liberação de peptídeos orexigênicos hipotalâmicos como o NPY e o AgRP (MORAN, 2009). Para analisar a maturidade deste sistema, estudo verificou que injeção de NPY no PVN pode aumentar igualmente o consumo de leite e de água aos 2 dias de vida (CAPUANO *et al.*,

1993). No entanto, o aumento seletivo no consumo de leite através de cateter oral ocorreu apenas no 15º dia (CAPUANO *et al.*, 1993).

Ao contrário do nosso estudo, outro estudo com hibridização *in situ* no hipotálamo, observou que aos 11 dias de vida há elevação de NPY em resposta a sucção na porção caudal do núcleo arqueado do hipotálamo, mas não na porção ventral (LI *et al.*, 1998). Provavelmente, em idade precoce, pode haver resposta do NPY ao estímulo alimentar, no entanto, este deve ser restrito a determinadas regiões, assim não observamos alteração ao analisar o hipotálamo completo. Com nossos resultados, podemos considerar a resposta dos peptídeos orexigênicos aos 18 dias de vida como padrão adulto. Estudos com ratos neonatos identificam inibição do consumo em resposta a lipídios da dieta apenas após os 15 dias de vida (WELLER *et al.*, 1997). A solução isotônica de peptonas promoveu redução do consumo alimentar aos 18 dias de idade mas não aos 12 dias (WELLER e TSITOLOVSKYA, 2004). Este efeito não foi bloqueado por antagonista da CCK, indicando que a ação de peptonas não ocorre via CCK (WELLER e TSITOLOVSKYA, 2004). No entanto, aos 10 dias de vida essas respostas não foram semelhantes para os dois peptídeos. Nesta idade, a expressão gênica do NPY não responde ao jejum ou carga gástrica, calórica ou não. Isto pode indicar imaturidade do sistema para detecção de tais estímulos e para formulação de resposta em forma de aumento na expressão de NPY. Neurônios no hipotálamo lateral respondem diretamente a leptina, ou indiretamente via projeções do arqueado e núcleo dorsomedial aos 16 dias, mas não aos 10 dias de vida (GJERDE *et al.*, 2015). Foi demonstrado que o pico de expressão de NPY em todas as regiões hipotalâmicas é no 16º pós-natal (SINGER *et al.*, 2000). Em contrapartida, o sistema AgRP, encontra-se responsivo a carga gástrica calórica ou não. Apenas a distensão gástrica foi suficiente para aumentar a expressão de AgRP no hipotálamo. Esse aumento foi intensificado quando associou-se a distensão gástrica e conteúdo calórico

aos 10 dias. O AgRP atua de forma diferenciada do NPY, suprimindo a atividade do sistema anorexigênico ao antagonizar o receptor para POMC, o MC4R (HASKELL-LUEVANO e MONCK, 2001). Talvez a ação do AgRP em resposta a distensão gástrica e a carga energética em idade precoce, seja para proteger o sistema de efeitos anorexigênicos e inibição do consumo alimentar em fase de imprescindível para aquisição energética. Verificamos que um peptídeo anorexigênicos, o CART, está em elevada expressão nesta idade, e para garantir consumo adequado de leite a demanda de crescimento rápido, a ação de antagonismo do AgRP seja importante para reduzir o efeito de saciedade.

Os dois peptídeos anorexigênicos analisados neste estudo, o CART e a POMC, apresentaram níveis de expressão hipotalâmica diferentes a depender dos estímulos e idade. Assim, o jejum aumentou a expressão apenas da POMC aos 18 dias de vida, mas não do CART. A POMC não foi alterada aos 10 dias de idade em resposta ao jejum. Uma das características de ratos de 10 dias de idade, é o consumo de leite sem mecanismos de saciedade, podendo estes consumirem o volume relativo a sua capacidade gástrica limite (HOUPPT e EPSTEIN, 1973). O CART apresentou importante expressão gênica no hipotálamo em idade precoce, independente do estímulo alimentar o que pode estar relacionado ao seu papel no desenvolvimento do sistema nervoso em conjunto com a leptina (ELIAS *et al.*, 2001). Estudo observou elevada expressão de CART em regiões encefálicas como o córtex somatosensorial primário, o núcleo accumbens e o hipocampo aos 6 dias de idade (RODRIGUES *et al.*, 2011). No entanto, no hipotálamo a expressão foi diferenciada a depender do núcleo hipotalâmico (RODRIGUES *et al.*, 2011). No núcleo arqueado foi observado baixo nível de expressão de CART aos 6 dias comparado aos 26 ou 66 dias de vida, porém resultado contrário foi observado no núcleo pré-mamilar (RODRIGUES *et al.*, 2011). Diante da heterogeneidade na expressão gênica de CART nos núcleos do hipotálamo

durante o desenvolvimento, o resultado do presente estudo, torna-se coerente pois é um somatório da expressão de CART de toda a estrutura do hipotálamo. Corroborando com nossos achados, esses autores também observaram que houve redução da expressão gênica do CART com o aumento da idade, sendo menor aos 26 dias de vida quando comparado aos 6 dias em várias regiões encefálicas (RODRIGUES *et al.*, 2011).

A distensão gástrica aumentou a expressão de POMC aos 10 e 18 dias de vida. A carga calórica aumentou a expressão de CART aos 10 dias e não alterou na expressão de POMC. A expressão de CART foi mais expressiva na idade de 10 dias. Quanto ao POMC, aos P18 dias foi observada uma significativa expressão de POMC na presença de jejum. A expressão de POMC no hipotálamo é controversa, alguns autores afirmam que ocorre entre 24 e 30 dias de acordo com Mann *et al.* (1999), outros declaram que ocorre entre 20 e 28 segundo Rosen *et al.* (1989) (ROSEN e POLAKIEWICZ, 1989; MANN *et al.*, 1999). Isso nos mostra que diferente dos peptídeos orexigênicos a ação dos anorexigênicos não se consolidou neste período. Ao se avaliar o controle a curto prazo da expressão dos peptídeos CART aos P10 dias mostrou-se elevado na presença de alimento e distensão gástrica, deixando de ser significativa aos P18 dias. Enquanto POMC apresentou diferença significativa apenas na presença de distensão gástrica em ambas as idades. E reduzindo sua expressão na presença de alimento quando comparado a distensão gástrica. Isso nos leva a inferir que durante o período neonatal não há resposta eficaz através de POMC para disparo da saciedade. Alguns autores discutem que o estímulo mais eficaz para disparo da saciedade em neonatos é a distensão gástrica, o que corrobora com os nossos resultados (HOUPY e EPSTEIN, 1973). Contudo, na presença da carga energética o animal não possui sistema diferenciado de retenção da expressão dos neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos. Essa contradição pode estar relacionada à imaturidade das vias de projeção do ARC para os outros núcleos hipotalâmicos

antes dos 18 dias pós-natal (BOURET *et al.*, 2004). Sabe-se que os sensores nutricionais e os peptídeos hipotalâmicos são reguladores metabólicos através da integração dos sinais hormonais e de nutrientes no sistema nervoso central que visam manter a homeostase energética.

CONCLUSÃO

Portanto, foi demonstrado que os peptídeos orexigênicos maturam precocemente, podendo controlar a ingestão alimentar para suprir as necessidades energéticas durante esse período de intenso desenvolvimento do sistema nervoso central. Assim como, como os sensores nutricionais analisados, mTOR e AMPK, apresentaram significativa expressão gênica sendo capaz de sinalizar precocemente o estado energético do animal.

7.2 Artigo 2

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL E DA AÇÃO DA FENFLURAMINA SOBRE A INGESTÃO ALIMENTAR E ATIVAÇÃO NEURONAL NO HIPOTÁLAMO E NÚCLEOS DA RAFE DE RATOS NEONATOS

INTRODUÇÃO

Em ratos neonatos, a partir dos 6 dias de vida, a resposta de saciedade se dá especialmente através da distensão gástrica e o principal estímulo alimentar é a desidratação (HALL e BRUNO, 1984; PHIFER *et al.*, 1991). Acredita-se que os mecanismos de controle de ingestão alimentar sejam rudimentares, pois no neonato a resposta desse mecanismo ocorre pelo estado de hidratação e não pelo estado energético (SWITHERS, 2003). Ao primeiro dia de vida, são capazes de discriminar reforços aversivos para ingestão alimentar (JOHANSON e HALL, 1979). A percepção dos macronutrientes também acontece em idades diferenciadas ao longo do período neonatal. A percepção de glicose ocorre aos 12 dias de vida (WELLER *et al.*, 1996); a de lipídios entre 15 e 18 dias (WELLER *et al.*, 1997) e as proteínas entre os 13 e 18 dias pós-natal (WELLER e TSITOLOVSKYA, 2004).

O hipotálamo tem papel fundamental na regulação da ingestão alimentar e do peso corporal, apresentando um circuito neural, formado por projeções oriundas do núcleo arqueado (ARH) para outros núcleos hipotalâmicos entre estes paraventricular (PVN), dorsomedial (DMH) e ventromedial (VMH) (BOURET *et al.*, 2004; BOURET e SIMERLY, 2006). As projeções originadas no arqueado se desenvolve no período pós-natal, seguindo um domínio temporal (BOURET *et al.*, 2004; BOURET e SIMERLY, 2006). Do ARH para o dorsomedial e do ventromedial se desenvolve rapidamente e estão consolidadas ao P6, enquanto que as do paraventricular apresentam um padrão de inervação inicial entre P8 e P10 e do hipotálamo lateral (LHA) maturam tardiamente aos P12 (BOURET *et al.*, 2004;

BOURET e SIMERLY, 2006). O padrão adulto é estabelecido aos P30 (GROVE *et al.*, 2003). A ingestão de leite diminui gradualmente ao P18 e desaparece completamente na quarta semana de vida (MIYATA *et al.*, 2009), condizendo com o amadurecimento das vias hipotalâmicas.

Os primeiros neurônios serotoninérgicos, no rato, surgem entre o 10º e 14º dia de gestação (LAUDER e BLOOM, 1974). Estes neurônios formam em conjunto os núcleos da rafe, dispostos ao longo do tronco encefálico (LAUDER *et al.*, 1982; AZIMITIA, 1997). Desta região emitem projeções para diferentes áreas encefálicas conferindo ao sistema serotoninérgico participação em diferentes comportamentos (JACOBS e FORNAL, 1999). Dentre estes, o controle da ingestão alimentar, através ação da serotonina sobre os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} no hipotálamo estimulando a saciedade (HEISLER *et al.*, 2006). As primeiras projeções serotoninérgicas para o hipotálamo surgem durante o E16 (UGRUMOV *et al.*, 1989). A serotonina durante o período neonatal parece estimular o comportamento de sucção até o 9º dia de lactação (WILLIAMS *et al.*, 1979). Após esse período a serotonina passa a estimular a saciedade favorecendo a transição entre o aleitamento e a ingestão de alimentos sólidos (NOCK *et al.*, 1978). A transição completa do aleitamento ocorre aos 30 dias de vida pós-natal e este comportamento foi relacionado com alterações neuroquímicas e a serotonina parece estar diretamente envolvida com este evento (WILLIAMS *et al.*, 1979).

A desnutrição no período perinatal pode programar mecanismos que controlam o comportamento alimentar. Uma colaboração do nosso grupo de pesquisa observou recentemente o aumento na expressão de peptídeos hipotalâmicos orexigênicos e redução de anorexigênicos, associados a elevado consumo alimentar em desnutridos (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2010; OROZCO-SOLIS *et al.*, 2011). Por conseguinte, observamos que a desnutrição perinatal promove redução na ação hipofágica da serotonina atuando sobre receptores 5-HT_{1B},

porém não altera o efeito promovido sobre receptores 5-HT_{2C} (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008). Portanto, temos como objetivo avaliar a ação do sistema serotoninérgico sobre a ingestão alimentar em ratos neonatos em P10 e P18 e como a desnutrição proteica durante a gestação e lactação interfere nesse comportamento. Hipotetizamos que a desnutrição proteica promoverá hiporesponsividade da ação do sistema serotoninérgico sobre a ingestão alimentar de ratos neonatos, interferindo assim na maturação desse sistema.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o papel do sistema serotoninérgico na maturação de mecanismos do controle do comportamento alimentar durante a lactação e os efeitos da desnutrição perinatal sobre esse processo.

Específicos

Avaliar em animais com ou sem desnutrição aos 10 e 18 dias de idade:

- ✓ O percentual de ganho de peso em resposta a inibidor seletivo de recaptação da serotonina;
- ✓ Ativação neuronal em resposta a estímulo farmacológico ou alimentar no hipotálamo e núcleos da base;

MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos receberam aprovação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) nº do processo 23076.026104/2012-16. Foram utilizadas ratas albinas (200-250g de peso corporal) da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. A partir do diagnóstico as ratas prenhas foram transferidas para gaiolas individuais, e durante a gestação e lactação receberam dietas isocalóricas com diferentes concentrações de proteína formando os grupos experimentais: Controle (dieta normoprotéica com 17% de proteína), n=8 ou Desnutrido (dieta hipoprotéica com 8% de proteína), n= 8. Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes por mãe, na proporção de 4:4 (macho:fêmea). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições padrão de biotério temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18 horas), recebendo ração e água *ad libitum*.

Procedimentos experimentais

Teste de ingestão alimentar: Aos 10 e 18 dias de idade os filhotes foram separados das mães por um período de 4 horas e alocados em uma incubadora à 33°C. Em seguida, foi realizada estimulação através de fricção de haste flexível sobre a região genital dos filhotes para promover a excreção de urina e fezes. Posteriormente, os animais foram pesados. Logo após, foi realizado teste de ingestão alimentar durante 30 minutos (HALL e BRUNO, 1984; BLUMBERG *et al.*, 2006). Nesse teste, os filhotes foram colocados em incubadora (33°C) sobre superfície embebida de leite (fórmula infantil - Nestlé®). O consumo de leite foi obtido

pela diferença entre o peso corporal anterior e posterior ao teste seguindo a fórmula $[(\text{peso final} - \text{peso inicial}) * 100] - 100$. Para testar os efeitos da fenfluramina sobre o consumo alimentar dos animais, controles ou desnutridos, este fármaco foi aplicado 30 minutos antes do teste.

Atividade neuronal em resposta ao consumo de leite ou fenfluramina:

Os estímulos para análise da ativação neuronal foram realizados aos 10 e 18 dias de idade. Sessenta minutos antes da perfusão, os animais foram submetidos às seguintes condições: injeção de solução salina (NaCl 0,9%, s.c) e exposição ao leite ou injeção aguda de fenfluramina (3 mg/Kg p.c) e leite. Inicialmente, os animais receberam aplicação aguda de fenfluramina ou salina 30 minutos antes da oferta de leite em superfície embebida durante mais 30 minutos, posteriormente foram direcionados para perfusão. Assim, foram formados os grupos experimentais: Controle-Salina (CS), Controle-Fenfluramina (CF), Desnutrido-Salina (DS), Desnutrido-Fenfluramina (DF). Cada grupo foi constituído por cinco animais provenientes de diferentes ninhadas

Perfusão Transcardíaca em ratos neonatos de 10 e 18 dias de vida

Os animais foram perfundidos transcardiacamente após serem anestesiados profundamente com Cloridrato de Ketamina (Dopalen-Ceva®, Paulínia-São Paulo, Brasil, 1ml/Kg de p.c.) e Cloridrato de Xilazina (Anasedan – Ceva® Paulínia-São Paulo, Brasil, 0,10 ml/Kg de p.c.), por via intramuscular. Para a perfusão, foi aberta a cavidade torácica para obter acesso ao coração (NOGUEIRA *et al.*, 1997). Em seguida, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica (Milan® BP-600, Colombo, Paraná-PR, Brasil) e introduzida no ventrículo esquerdo do coração. A bomba foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da

integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foi infundida 150ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente para remoção do sangue dentro dos vasos. A perfusão com salina foi seguida com a infusão de solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4%, pH 7,4, a 4° C).

Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio, e pós-fixados na mesma solução fixadora mais sacarose (20%) durante 4 horas. Após esse período, foi armazenado em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio – PBS - mais sacarose 30%) por 6-24 h.

Imunohistoquímica contra a proteína Fos

Os cortes de uma série, contendo os núcleos da rafe e os núcleos hipotalâmicos foram processados para imunohistoquímica contra proteína c-Fos pelo *Método da Peroxidase-DAB*. Para isso, após lavagens sucessivas com solução tampão de fosfato de sódio, os cortes foram incubados com anticorpo primário (anti-c-fos (4) sc-52, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) sob a diluição de 1:200 por 48 horas, em câmara refrigerada a 4° C. Posteriormente, foram incubados em anticorpo secundário biotinilado (B8895-Anti-Rabbit IgG-Biotin antibody produced in goat, Sigma-Aldrich®, São Paulo-SP, Brasil) sob diluição 1:800 por 90 min, em câmara refrigerada a 4°C. Após amplificação do sinal com o Complexo Avidina-Biotina (Kit Vectastain P-4000, Vector Laboratories®, California, USA) com incubação por 90 min, a revelação foi realizada com solução de 3,3 Diaminobenzidina (DAB- Sigma-Aldrich®, São Paulo-SP, Brasil) diluído em H₂O com cloreto de amônio, Beta d-glicose e NAS (Sulfato de Niquel (II) hexahidratado e Acetato de Sódio, Sigma-Aldrich®, São Paulo-SP, Brasil), posteriormente a reação foi ativada com glicose oxidase (Glucose

oxidase from *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich®, São Paulo-SP, Brasil), até o aparecimento da coloração negra nos neuronios ativados pela c-Fos.

Contagem dos Neurônios imunorreativos a proteína Fos

Os cortes foram montados em lâmina e lamínula fixada com Entellan®-Merck-Millipore (Darmstadt, Alemanha), seguindo o Atlas *The Rat in Stereotaxic Coordinates Paxinos & Watson* (6ª edição, Elsevier). As imagens das lâminas foram capturadas, com auxílio de Microscópio Óptico e Sistema de Captação de Imagem (Axio Imager 2 Zeiss™, Monique-Alemanha; com a objetiva de 10x). E todas as células com marcação negra evidente foram contadas, nas regiões selecionadas, através do Programa Image Pro® Plus Versão 6.0 para Windows (Silver Spring, Maryland, USA).

As regiões selecionadas estão localizadas nas seguintes faixas do Bregma: *Para o hipotálamo:* N. Arqueado (-1.80mm ao -3.48mm); N. Paraventricular (-1.80mm ao -2.28mm), N. Ventromedial (-1.80mm ao -3.36mm); N. Dorsomedial (-2.40mm ao -3.60mm);. Para os *núcleos da rafe* foram selecionados o mediano (-7.08mm ao -8.64mm) e dorsal (-6,96mm ao -8.09mm).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM. Para comparação do percentual do ganho de peso e o número de células c-fos positivas foi utilizado o teste ANOVA One Way, seguido do pós-teste Bonferroni para avaliação da ativação de células imunorreativas a proteína FOS ou Tukey para o percentual de ganho de peso. Para fins estatísticos em todas as comparações foi considerada a significância de $p < 0,05$. Os dados foram analisados no GraphPadPrism 5.0 versão 7 (<http://www.graphpad.com>).

RESULTADOS

Avaliação do percentual de ganho de peso em resposta ao consumo de leite sob a ação aguda de fenfluramina

Aos 10 dias de vida (Figura 1A) foi observado redução do percentual de ganho de peso dos animais do grupo Controle-Fenfluramina ($1,89 \pm 0,30$; $n=10$; $p=0,022$) em relação ao Controle-Salina ($0,5 \pm 0,29$; $n=10$). O mesmo padrão foi observado com os animais do grupo Desnutrido-Fenfluramina ($1,62 \pm 0,32$; $n=9$; $p=0,0036$) em relação ao grupo Desnutrido-Salina ($0,43 \pm 0,16$; $n=9$).

Aos 18 dias de vida não foi observado diferença no percentual de ganho peso dos animais do grupo Controle-Fenfluramina ($1,09 \pm 0,19$; $n=9$; $p=0,368$) em relação ao grupo Controle-Salina ($1,32 \pm 0,16$; $n=9$) (Figura 1B). Por outro lado, o grupo Desnutrido-Fenfluramina ($2,32 \pm 0,36$, $n=10$; $p=0,017$) apresentou maior ganho de peso em relação ao grupo Desnutrido-Salina ($1,19 \pm 0,24$; $n=10$).

Não foi observada significância no percentual de ganho de peso corporal por influência da dieta materna, aos 10 e 18 dias de vida quando comparamos o grupo Controle-Salina com Desnutrido-Salina em todas as análises $p>0,05$.

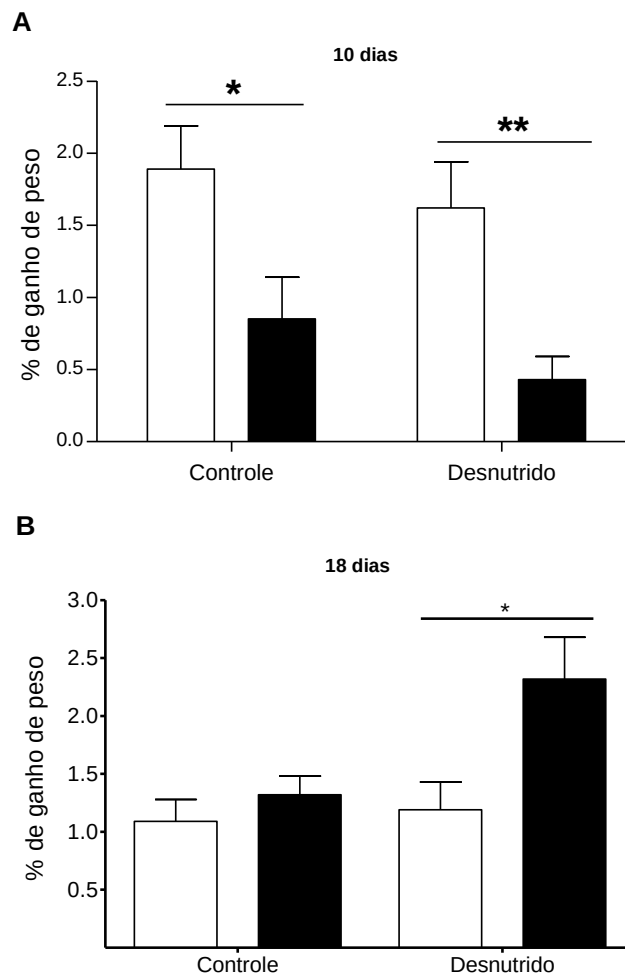


Figura 1: Percentual de ganho de peso de animais dos grupos controle e desnutridos em resposta à fenfluramina. O teste foi realizado aos 10 dias (A, n=9-10) e aos 18 dias de vida (B, n=9-10). Ratos receberam dieta hipoproteica (8% proteína) ou controle (17% proteína) durante a gestação e lactação. A barra branca (□) refere-se ao grupo salina e a barra preta (■) ao grupo fenfluramina. Utilizou-se ANOVA One Way, seguido do pós-teste de Tukey; * valores significantes para $p < 0,05$.

Número de células ativadas em resposta ao consumo de leite e aplicação aguda de fenfluramina em núcleos hipotalâmicos e da rafe

Aos 10 dias de vida não foi observado diferença no número de células c-fos positivas no núcleo arqueado entre os grupos Controle-Fenfluramina (CF: $8,75 \pm 3,45$; n=4; $p=0,5914$) e Salina (CS: $11,11 \pm 2,33$; n=4). Do mesmo modo ocorreu no grupo Desnutrido-Fenfluramina (DF: $12,38 \pm 2,17$; n=4; $p=0,7041$) com o Desnutrido-Salina (DS: $13,75 \pm 2,68$;

n=4) (Figura 2A). A análise do núcleo paraventricular revelou maior número de células c-fos positivas no grupo Controle-Fenfluramina (CF: $24,50 \pm 3,97$, n=4; $p=0,0217$) e no grupo Desnutrido-Fenfluramina (DF: $28,25 \pm 3,34$, n=4; $p=0,0467$) quando comparado aos seus respectivos Controles (CS: $11,75 \pm 1,18$; n=4; DS: $18,50 \pm 2,02$; n=4) (Figura 2B). A análise do núcleo ventromedial revelou redução no grupo Controle-Fenfluramina (CF: $4,00 \pm 1,76$, n=4; $p=0,0200$) quando comparado ao grupo Salina (CS: $13,43 \pm 2,43$, n=4). No entanto, não houve diferença entre o grupo Desnutrido-Fenfluramina (DF: $4,50 \pm 0,82$; n=4; $p=0,081$) e Desnutrido-Salina (DS: $8,17 \pm 1,59$; n=4) (Figura 2C). No núcleo dorsomedial não houve modificação número de células c-fos positivas nos grupos Controle-Fenfluramina (CF: $5,75 \pm 1,81$; n=4; $p=0,4341$) e Desnutrido-Fenfluramina (DF: $5,60 \pm 1,037$; $p=0,6143$) quando comparados aos seus controles (CS: $9,0 \pm 3,43$, n=4; DS: $4,86 \pm 0,93$; n=4) (Figura 2D).

A comparação entre os grupos segundo a manipulação materna aos 10 dias de vida, Controle-Salina comparado ao grupo Desnutrido-Salina ($p > 0,05$), revelou que a ativação de células c-fos ativadas não foi significativa nos núcleos hipotalâmicos analisados: ARC- Controle-Salina (CS: $11,11 \pm 2,33$, n=4; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo Desnutrido (DS: $13,75 \pm 2,68$; n=4); PVN- Controle-Salina (CS: $11,75 \pm 1,18$; n=4; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $18,50 \pm 2,02$; n=4). DMH- Controle-Salina (CS: $9,0 \pm 3,43$, n=4; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $4,86 \pm 0,93$; n=4); VMH - Controle-Salina (CS: $13,43 \pm 2,43$, n=4; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $8,17 \pm 1,59$; n=4).

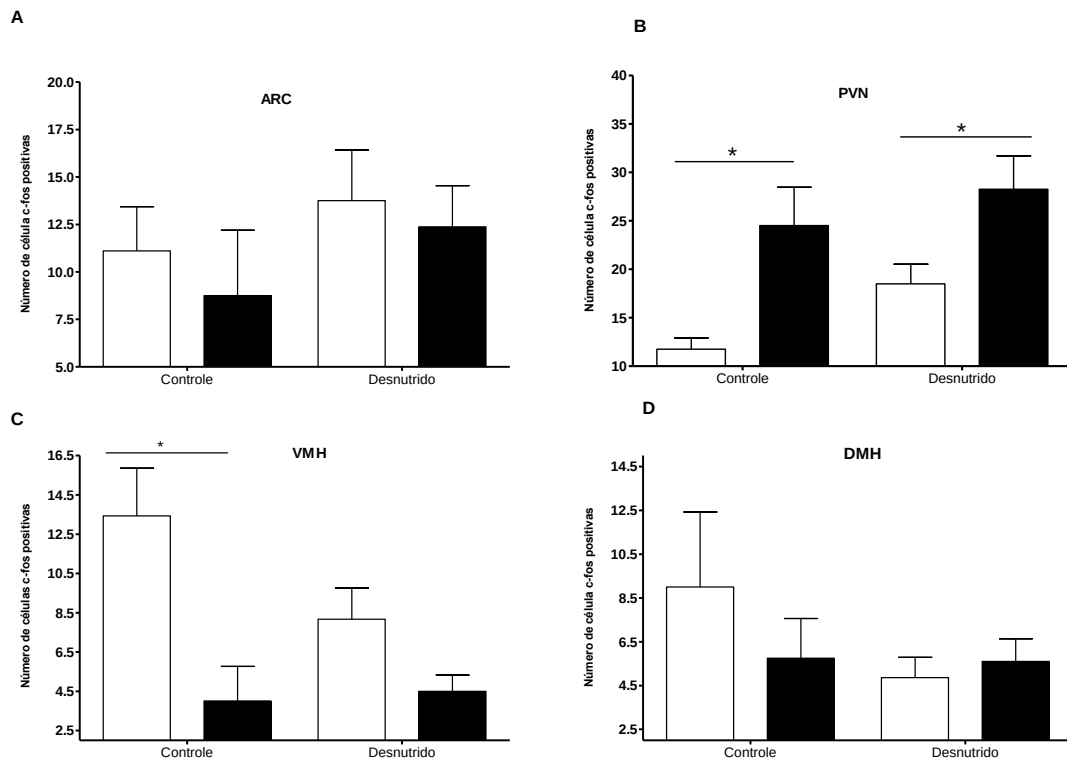


Figura 2: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos hipotalâmicos de animais controle e desnutrido aos 10 dias de vida. Ratos receberam dieta hipotroteica (8% proteína ou controle (17% proteína) durante a gestação e lactação. ARC (núcleo arqueado do hipotálamo) (A); PVN (núcleo paraventricular do hipotálamo) (B); VMH (núcleo ventromedial do hipotálamo) (C); DMH (núcleo dorsomedial do hipotálamo) (D). A barra branca refere-se ao grupo salina, $n=4$ ($\square$) e a barra preta ao grupo fenfluramina, $n=4$ ($\blacksquare$). Utilizou-se ANOVA One Way, seguido do pós-teste Bonferroni; * valores significantes para $p<0,05$.

Aos 10 dias de vida a análise do núcleo dorsal da rafe não revelou diferenças no número de células c-fos ativadas, no grupo Controle-Fenfluramina (CF: $3,50 \pm 0,82$; $n=4$; $p=0,2326$) quando comparado ao grupo Controle-Salina (CS: $2,17 \pm 0,58$; $n=4$). Bem como, no grupo Desnutrido-Fenfluramina (DF: $7,50 \pm 1,7$; $n=4$; $p=0,4142$) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $5,67 \pm 1,2$; $n=4$) (Figura 3A). A análise do mediano da rafe, aos 10 dias de vida, revelou que não há diferença no número de células c-fos ativadas entre o grupo Controle-Fenfluramina (CF: $3,17 \pm 0,86$; $n=4$; $p=0,3723$) e grupo Controle-Salina (CS: $4,17 \pm 0,58$; $n=4$). Entretanto ocorre aumento no grupo Desnutrido- Fenfluramina (DF: $6,76 \pm 1,08$; $n=4$; $p=0,0072$) comparado ao Desnutrido-Salina (DS: $2,00 \pm 0,45$; $n=4$) (Figura 3B).

A comparação entre os grupos segundo a manipulação materna aos 10 dias de vida, Controle-Salina comparado ao grupo desnutrido-salina ($p > 0,05$), revelou que a ativação de células c-fos ativadas não foi significativa nos núcleos da rafe analisados: DR- Controle-Salina (CS: $2,17 \pm 0,58$; $n=4$; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $5,67 \pm 1,2$; $n=4$) e MnR- Controle-Salina (CS: $4,17 \pm 0,58$; $n=4$; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $2,00 \pm 0,45$, $n=4$).

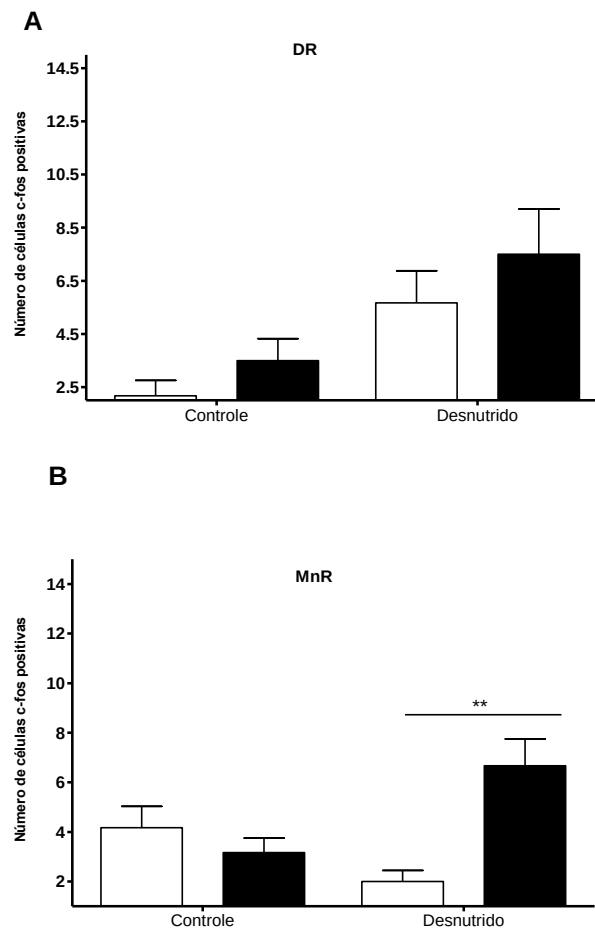


Figura 3: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos dorsal (A) e mediano da rafe (B) aos 10 dias de vida. Ratos receberam dieta hipotroteica (8% proteína) ou controle (17% proteína) durante a gestação e lactação. MnR (núcleo mediano da rafe); DR (núcleo dorsal da rafe). A barra branca refere-se ao grupo salina, $n=4$ (□) e a barra preta ao grupo fenfluramin, $n=4$ (■). Utilizou-se ANOVA One Way, seguido do pós-teste Bonferroni; * valores significantes para $p < 0,05$.

Em animais controle, aos 18 dias de idade, a injeção de fenfluramina aumentou o número de células c-fos positivas nos núcleos arqueado (CF: $111 \pm 3,16$, n=5, versus CS: $50,25 \pm 7,50$; n=5; p=0,0200, Figura 4A), PVN (CF: $262,8 \pm 47,5$; n=5, versus CS: $54,25 \pm 4,31$; n=5; p=0,0023; Figura 4B), ventromedial (CF: $139,5 \pm 7,31$; n=5; versus CS: $70,0 \pm 16,25$; n=5; p=0,0045; Figura 4C) e dorsomedial (CF: $242,3 \pm 57,58$; n=5; versus CS: $36,0 \pm 10,28$; n=5; p=0,0078; Figura 4D).

Por outro lado, em animais desnutridos, a fenfluramina não altera a ativação de células imunorreativas a proteína FOS nos núcleos: arqueado (DF: $144,0 \pm 8,74$; n=5; versus DS: $112,3 \pm 15,36$; n=5; p= 0,1101; Figura 4A) e ventromedial (DF: $81,50 \pm 18,02$; n=5; versus DS: $201,8 \pm 11,38$, n=5; p=0,0115; Figura 4C). No grupo desnutrido, nos núcleos PVN (DF: $200,8 \pm 24,38$; n=5; versus DS: $234,5 \pm 43,32$, n=5; p<0,006; Figura 4B) e dorsomedial (DF: $94,0 \pm 15,69$; n=5, versus DS: $252,7 \pm 47,01$; n=5; p=0,0126; Figura 4D) houve redução das células imunorreativas a proteína FOS em resposta a fenfluramina.

A comparação entre os grupos segundo a manipulação materna aos 18 dias de vida, controle-salina comparado ao grupo Desnutrido-Salina, revelou que a ativação de células c-fos ativadas aumentou significativamente nos núcleos hipotalâmicos analisados: ARC- Controle-Salina (CS: $50,25 \pm 7,50$; n=5; p<0,05) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $112,3 \pm 15,36$, n=5); PVN- Controle-Salina (CS: $54,25 \pm 4,31$; n=5, p<0,05) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $234,5 \pm 43,32$, n=5). DMH- Controle-Salina (CS: $36,0 \pm 10,28$; n=5; p<0,05) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $252,7 \pm 47,01$; n=5) e VMH: Controle-Salina (CS: $70,0 \pm 16,25$; n=5, p<0,05) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $201,8 \pm 11,38$; n=5).

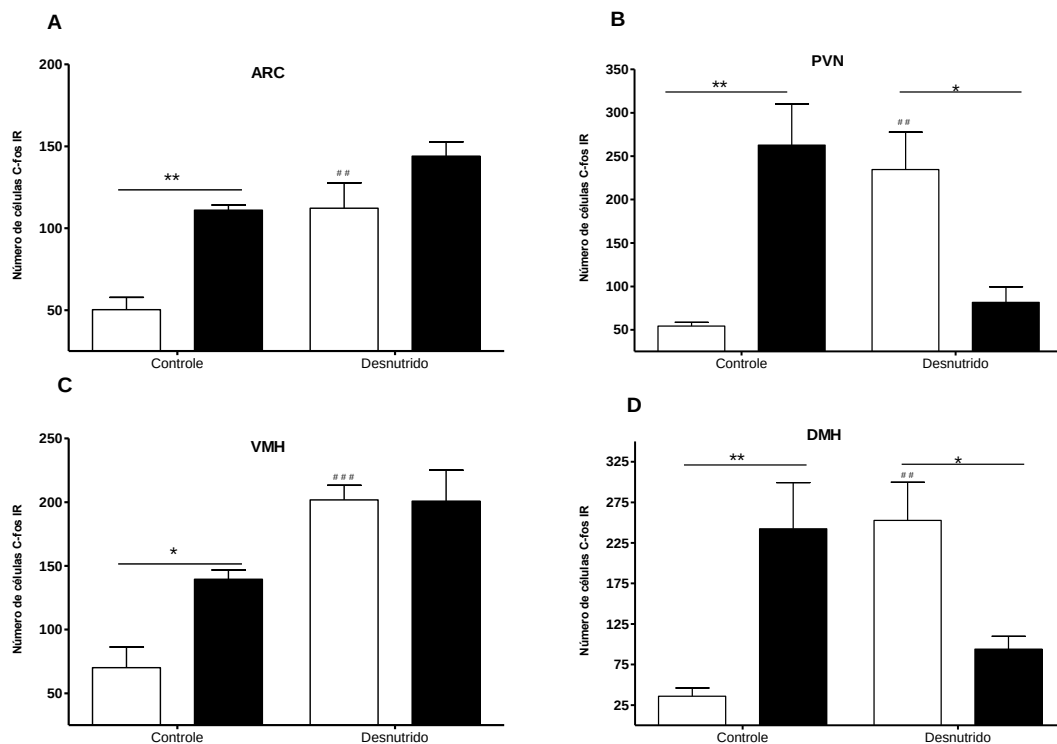


Figura 4: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos hipotalâmicos de animais controle e desnutrido aos 18 dias de vida. Ratos receberam dieta hipotroteica (8% proteína) ou controle (17% proteína) durante a gestação e lactação. ARC (núcleo arqueado do hipotálamo) (A); PVN (núcleo paraventricular do hipotálamo) (B); VMH (núcleo ventromedial do hipotálamo) (C); DMH (núcleo dorsomedial do hipotálamo) (D). A barra branca refere-se ao grupo salina, n=5 (□) e a barra preta ao grupo fenfluramina, n=5 (■). Foi utilizado ANOVA One Way, seguido do pós-teste Bonferroni; * valores significantes para $p < 0,05$; # comparado com Controle-Salina e $p < 0,05$.

As análises nos núcleos da rafe revelaram redução no número de células imunorreativas a proteína FOS apenas no núcleo mediano em resposta ao consumo de leite e aplicação aguda de fenfluramina em animais controle (CF: $10,50 \pm 3,83$; n=5; versus CS: $25,67 \pm 3,42$; n=5; $p=0,0042$), aos 18 dias de vida. Enquanto que no dorsal não foi observada diferença entre os grupos (CF: $28,80 \pm 2,67$; n=5, versus CS: $37,50 \pm 4,65$; n=5, $p=0,1433$). Em relação ao grupo desnutrido, foi observada redução no número de células c-fos positivas nos núcleos dorsal (DF: $17,33 \pm 1,69$; n=5; versus DS: $99,00 \pm 17,71$; n=5, $p=0,0018$; Figura 5A), e mediano da rafe (DF: $16,33 \pm 1,13$; n=5; versus DS: $55,0 \pm 5,75$; n=5, $p=0,0002$; Figura 5B).

A comparação entre os grupos segundo a manipulação materna aos 18 dias de vida, controle-salina comparado ao grupo Desnutrido-Salina, revelou que a ativação de células c-fos ativadas aumentou significativamente nos núcleos da rafe analisados: MnR – Controle-Salina (CS: $25,67 \pm 3,42$; $n=5$; $p<0,05$) quando comparado ao grupo Desnutrido-Salina (DS: $55 \pm 5,75$, $n=5$); e no DR - Controle-Salina (CS: $37,50 \pm 4,65$; $n=5$; $p<0,05$) quando comparado ao Desnutrido-Salina (DS: $99,00 \pm 17,71$; $n=5$).

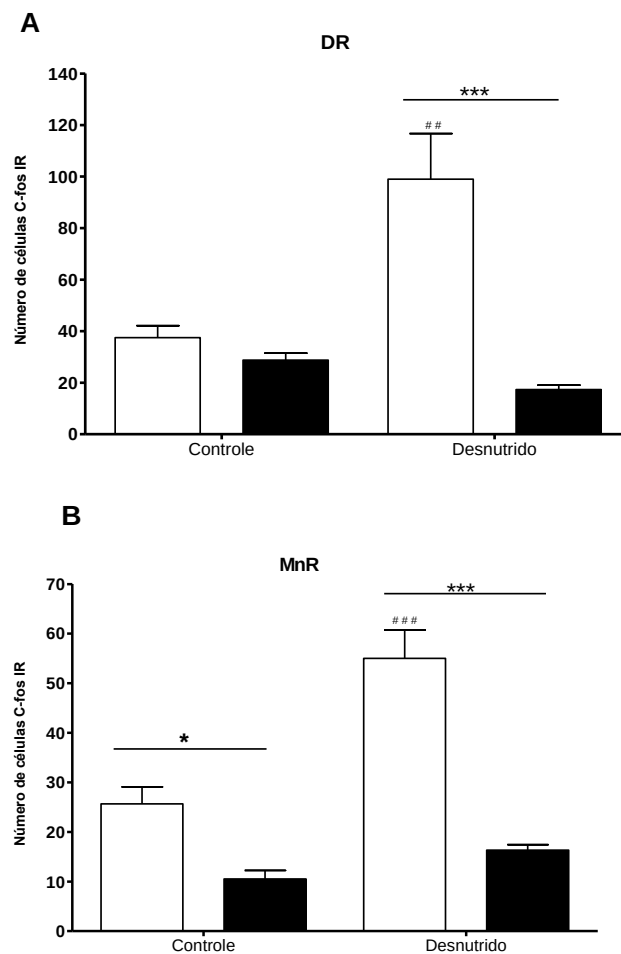


Figura 5: Ativação de células imunorreativas a proteína FOS em resposta à aplicação de fenfluramina e ingestão de leite nos núcleos dorsal (A) e mediano da rafe (B) aos 18 dias de vida. Ratos receberam dieta hipotroteica (8% proteína), ou controle (17% proteína) durante a gestação e lactação. MnR (núcleo mediano da rafe); DR (núcleo dorsal da rafe). A barra branca refere-se ao grupo salina, $n=5$ (□) e a barra preta ao grupo fenfluramina, $n=5$ (■). Utilizou-se ANOVA One Way, seguido do pós-teste Bonferroni; * valores significantes para $p<0,05$.

DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a ingestão alimentar e ativação neuronal em resposta a fenfluramina, em ratos neonatos que sofreram ou não má-nutrição proteica durante a gestação e lactação. Nossos resultados revelaram que a desnutrição promove redução do percentual de ganho de peso em resposta à ação da fenfluramina aos 10 dias, assim como no grupo controle, e aumento aos 18 dias em desnutridos. A fenfluramina não altera o ganho de peso aos 18 dias para animais normonutridos. Estes resultados demonstram que aos 10 dias de vida, independente da manipulação nutricional, os animais respondem a fenfluramina com redução do percentual de ganho de peso corporal. Por outro lado, aos 18 dias, a desnutrição promove efeito contrário, inibindo o efeito anorético da fenfluramina, levando ao aumento do percentual de ganho de peso. Foram analisados os efeitos da desnutrição sobre o número de células c-fos positivas em resposta a fenfluramina e ingestão de leite em alguns núcleos hipotalâmicos e da rafe. Houve aumento destas células em animais normonutridos aos 10 dias de vida no núcleo paraventricular e redução no ventromedial e nenhum efeito no arqueado e no dorsomedial. Em animais controle aos 18 dias de vida, a fenfluramina e a ingestão de leite promoveram aumento no número de células ativadas em todos núcleos hipotalâmicos analisados. E entre os núcleos da rafe analisados redução no mediano.

Nossos resultados revelaram que a desnutrição não afeta a ativação de células c-fos positivas aos 10 dias de vida no núcleo arqueado, no ventromedial e no dorsomedial, entretanto aumenta no núcleo paraventricular. Nos núcleos da rafe houve aumento no número de células no mediano. Aos 18 dias há redução da ativação de células no paraventricular e no dorsomedial. Em relação aos núcleos da rafe houve redução de ativação no dorsal e no mediano em resposta a fenfluramina.

Como falado anteriormente observamos o efeito da fenfluramina sobre o ganho de peso corporal especialmente aos 10 e 18 dias pós-natal. Foi observado que estímulo da neurotransmissão serotoninérgica promove redução do comportamento de sucção entre 10-15 dias de vida (NOCK *et al.*, 1978; WILLIAMS *et al.*, 1979; SPEAR e RISTINE, 1981). Outro observou que agonismo farmacológico serotoninérgico promoveu inibição do aleitamento em animais privados de 10 e 21 dias de vida (WILLIAMS *et al.*, 1979). Por outro lado, estudos que mostram que antagonismo serotoninérgico estimula o aleitamento em ratos a partir dos 15 dias de vida (WILLIAMS *et al.*, 1979; RISTINE e SPEAR, 1984). Esses dados sugerem que a maturação do sistema serotoninérgico pode ter um papel-chave para a iniciação do comportamento de aleitamento. A fenfluramina é um liberador e inibidor da recaptação de serotonina, aumentando a disponibilidade pós-sináptica deste neurotransmissor (ROWLAND e CARLTON, 1986). Como consequência desse mecanismo, a serotonina apresentará aumento de sua concentração encefálica em diferentes áreas cerebrais (ROWLAND e CARLTON, 1986). Além disso, a fenfluramina tem o hipotálamo como fundamental sitio de ação (OLUYOMI *et al.*, 1994), o que possivelmente pode interferir no resultado final da neurotransmissão serotoninérgica sobre o comportamento de aleitamento.

Diferentes receptores podem influenciar no comportamento de aleitamento, interferindo sobre a ingestão alimentar e consequente ganho de peso, o que contribui para os diferentes efeitos da serotonina, nas idades analisadas. A análise do comportamento de aleitamento entre P17-P18, com a manipulação de diferentes agonistas dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT₂, revelou que o agonismo sobre o 5-HT_{1A} estimula o comportamento de *mouthing* (abrir e fechar a cavidade oral), mas não houve significância com os agonistas de 5-HT_{1B} e 5-HT₂ sobre este comportamento, embora tenham diminuído os comportamentos de locomoção e exploração dos neonatos (FRAMBES *et al.*, 1990). A manipulação de um

antagonista serotoninérgico não causou efeito sobre o comportamento de aleitamento aos 10 dias pós-natal. Aos 15 dias pós-natal a droga age efetivamente sobre o comportamento de movimento da cavidade oral enquanto eles estão ligados a mãe e mamando. Em contraste os animais salina permaneceram relativamente imóveis durante o teste (WILLIAMS *et al.*, 1979). O mesmo estudo avaliou o efeito de agonista serotoninérgico, a quipazina, que aumenta a atividade da via serotoninérgica. E observaram que a quipazina reduz drasticamente o tempo de aleitamento aos 10 dias de vida (WILLIAMS *et al.*, 1979). Corroborando com os nossos resultados aos 10 dias, que os animais de ambos os grupos apresentaram redução do percentual de ganho de peso, que indiretamente reflete o consumo de leite do animal durante o teste.

No nosso estudo, aos 18 dias de vida não foi observada significância dos animais do grupo controle, mas aumento do ganho de peso nos animais desnutridos. Diferentemente, foi visto que animais privados entre P17 e P18 sob efeito de agonista do receptor 5HT_{1A}, apresentaram significante perda do ganho de peso quando comparados aos animais salina, este resultado foi atribuído ao menor tempo de sucção (SPEAR *et al.*, 1991). Em animais normonutridos adultos a fenfluramina causa hipofagia (VOIGT e FINK, 2015). Embora nosso trabalho, traga resultados diferentes, pode-se creditar esta diferença ao tipo e dose de fármaco utilizado. O aumento do ganho de peso observado nos animais desnutridos do nosso estudo reflete indiretamente a inibição do efeito anorético da fenfluramina. Um estudo observou em animais aos 35 dias que sofreram desnutrição proteica, apresentaram um efeito atenuado da fenfluramina sobre o consumo de alimento, com 30% da redução da quantidade de alimento ingerida por estes animais, enquanto que nos animais controle a redução foi cerca de 62% (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008). O mesmo estudo observou a expressão gênica de dois receptores serotoninérgicos, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} e concluiu que não há diferença na expressão

desses receptores embora tenha ocorrido hiporesponsividade do receptor 5-TH_{1B}, frente a ação de seu agonista (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008). A desnutrição também aumentou concentração da serotonina do 1º ao 21º dias pós-natal, em diferentes áreas cerebrais (MANJARREZ *et al.*, 2003). Em contrapartida, também observaram que ocorre dessensibilização dos receptores durante o período de desenvolvimento em animais desnutridos (MANJARREZ *et al.*, 2003). Essas alterações em componentes do sistema serotoninérgico podem ser um dos agentes das alterações do controle da ingestão alimentar dos neonatos submetidos à desnutrição.

A análise do número de células ativadas nas idades analisadas nos revela que há uma mudança no padrão de ativação entre 10 e 18 dias pós-natal, tanto nos animais normonutridos quanto nos desnutridos. Primeiramente pôde-se observar que numa idade mais precoce como aos 10 dias que o padrão de ativação celular nos núcleos hipotalâmicos é similar entre animais normonutridos ou não. Isso demonstra que a desnutrição materna não afeta diretamente a responsividade celular em resposta a ingestão do leite e fenfluramina. Um trabalho observou em neonatos com apenas P2 intensa marcação de c-fos em diferentes áreas encefálicas, especialmente no PVN (RINAMAN *et al.*, 1997). Em outro foi visto no NTS um pico de células c-FOS-IR entre o P5-P7 em animais (HIRONAKA *et al.*, 2000). Aos P9 a expressão de Fos foi induzida pela ingestão de leite no NTS quando comparados com animais em jejum (MORALES *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que os níveis de controle da ingestão alimentar começam a se consolidar precocemente. O segundo ponto a se destacar nos animais aos 10 dias de vida é que a redução no ganho de peso pode ser relacionado a maior ativação de células no núcleo paraventricular do hipotálamo. O núcleo paraventricular recebe projeções oriundas do arqueado, e aos P10 essas projeções são evidentes (BOURET *et al.*, 2004). Em estudo recente foi visto que a ação inibitória da ingestão alimentar via

paraventricular se dá através da ativação de MC4R (SHAH *et al.*, 2014). Dois receptores são responsáveis pela ação da serotonina no controle da ingestão alimentar 5-HT_{1B} expressos em neurônios que expressão NPY e AgRP e o 5-HT_{2C} expressos em neurônios POMC cujo receptor é o MC4R. Portanto drogas serotoninérgicas como a fenfluramina geram hipofagia através do aumento da concentração da serotonina e consequente ação sobre seus receptores especialmente 5-HT_{2C} (HEISLER *et al.*, 2002).

Aos 18 dias houve um aumento da ativação dos núcleos hipotalâmicos dos animais controle em detrimento de hiporresponsividade dos animais submetidos à desnutrição. Essa hiporresponsividade pode ser atribuída ao papel programador da desnutrição em fases precoces da vida. Há diferentes relatos de consequências da desnutrição sobre os níveis de controle da ingestão alimentar. Um estudo observou aumento da densidade de NPY aos P15, nos núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo em animais submetidos à restrição proteica durante o período neonatal (ROCHA *et al.*, 2014). Em trabalho recente foi observado que a desnutrição aumenta a expressão gênica de NPY e diminui a de POMC em animais privados de alimentação (TUNGALAGSUVD *et al.*, 2015). Também foi visto que a desnutrição reduz a expressão gênica de POMC em neonatos entre P14 e P30, entretanto não houve diferenças significativas na expressão de NPY entre o período analisado P4 – P30 (DELAHAYE *et al.*, 2008). A análise do núcleo arqueado, em animais restritos durante a gestação, de neurônios c-Fos positivos revelou que na vida adulta cerca de 30% destes neurônios expressam POMC (BRETON *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que as alterações do controle da ingestão alimentar podem estar associadas com a má-nutrição em fases precoces da vida, causadas por modificações anatômicas nas vias hipotalâmicas que regulam o comportamento alimentar, seja ao nível de peptídeos ou neurotransmissores como foi visto em nosso trabalho, com a serotonina, através da aplicação de fenfluramina.

Os núcleos da rafe enviam projeções do tronco encefálico para diferentes regiões encefálicas entre estas o hipotálamo. Na parte rostral do núcleo da rafe se localizam o Dorsal da Rafe (DR) e o Mediano da Rafe (MnR) ambos possuem aferências serotoninérgicas para o núcleo ventromedial do hipotálamo que contribuem na regulação do comportamento alimentar (TAKASE e NOGUEIRA, 2008). De uma maneira geral drogas agonistas da via serotoninérgica que agem nestes núcleos e promovem inibição da ingestão alimentar enquanto que antagonistas estimulam o consumo de alimentos (WIRTSHAFTER, 2001).

A análise quantitativa de c-fos nos núcleos da rafe aos 10 dias apresentou significância apenas no MnR do animal desnutrido o que sugere sua participação na redução do ganho de peso desses animais juntamente com outros núcleos hipotalâmicos. O núcleo mediano envia a maioria das projeções serotoninérgicas para o prosencéfalo (WIRTSHAFTER, 2001). Fármacos que inativam o MnR levam ao aumento da ingestão alimentar e da sede, alterando diferentes variáveis entre estas palatabilidade, quantidade de alimento (WIRTSHAFTER, 2001). O efeito da aplicação aguda de fenfluramina nos animais desnutridos pode ser resultado de uma função ímpar que este núcleo apresenta sobre a ingestão de alimentos sólidos ou líquidos.

Com o passar do desenvolvimento, aos 18 dias, foi observado com estímulo agudo da fenfluramina redução no número de c-fos no DR desnutrido e no MnR em ambos os grupos controle e desnutrido. Diferentemente do que foi observado no presente estudo, em animais privados de proteína durante o desenvolvimento apresentam maior atividade espontânea de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe (SODERO *et al.*, 2006). Outro estudo observou que a desnutrição não foi capaz de alterar o número de células nos núcleos mediano e dorsal da rafe (KING *et al.*, 2002). Nossos resultados, portanto, revelam que a consolidação da via serotoninérgica no núcleo mediano da rafe ocorre precocemente aos 10 dias em ratos

submetidos a desnutrição, e apenas aos 18 dias com os animais controle. Quanto o núcleo dorsal, segundo nossas observações não há um padrão significativo para os animais controle em nenhuma das idades analisadas. Entretanto em animais desnutridos este núcleo responde a ação da fenfluramina.

CONCLUSÃO

A desnutrição proteica é capaz de interferir em diferentes eventos e processos ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso. Neste estudo investigamos seus efeitos sobre o comportamento alimentar neonatal. Pouco se sabe sobre os eventos encefálicos que levam a consolidação do processo de *suckling* em neonatos e quais vias de neurotransmissão participam desse processo. Nosso estudo avaliou a via serotoninérgica em duas idades ao longo do período de lactação P10 e P18. Podemos concluir que em animais controle a ação serotoninérgica é bem consolidada aos 18 dias de idade, especialmente sobre os núcleos hipotalâmicos. Por outro lado, nos núcleos dorsal e mediano da rafe não foi observado padrão de amadurecimento nesta idade. Quanto nos animais submetidos à desnutrição, o padrão de ativação celular aos 10 dias mostrou-se como em animais controle, com destaque para o núcleo PVN. Entretanto aos 18 dias de idade, os animais desnutridos apresentaram aumento do ganho de peso corporal e um padrão de ativação de células c-fos positivas heterogêneo nos núcleos hipotalâmicos analisados. Quanto ao núcleo mediano houve resposta precoce a ação farmacológica da fenfluramina. Os dados deste estudo indicam que a ação da via serotoninérgica sobre a ingestão alimentar em neonatos pode ter sido retardada pela desnutrição proteica precoce.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como propostas avaliar mecanismos do controle central da ingestão alimentar em neonatos e os efeitos da desnutrição neste processo. Foram escolhidas as idades de 10 dias, elevada dependência materna, e 18 dias, início da transição entre o aleitamento e a ingestão de alimentos sólidos. As análises celulares e moleculares foram realizadas no hipotálamo, por ser estrutura importante de controle do comportamento alimentar com mecanismos celulares bem conhecidos. Muitos são os achados sobre os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre estes mecanismos, no entanto, as informações são de organismos adultos. Neste estudo, nos propusemos a realizar análises do efeito da desnutrição no controle do comportamento alimentar durante o período de aleitamento.

Foi observado que a expressão gênica dos sensores energéticos AMPK e mTOR ocorre em resposta ao estado de jejum e alimentado, seja aos P10 ou P18. Entretanto a expressão dos peptídeos hipotalâmicos ocorre efetivamente aos P18, especialmente para os da via orexigênica NPY e AgRP. A análise da expressão gênica após carga gástrica calórica ou não, indicou que a distensão gástrica é o principal estímulo do controle alimentar nesse período, independente da idade. Em conjunto, esses resultados nos permitem inferir que há em neonatos resposta a longo e curto prazo no controle da ingestão alimentar, sendo efetivo aos P18.

Verificamos que a desnutrição reduziu a ação anorética da fenfluramina ao P18, proporcionando aumento do ganho de peso. Em adição, em organismos desnutridos da fenfluramina promoveu redução do número de células ativadas, no PVN e os núcleos MnR e DR aos 18 dias de vida. Estes núcleos podem ser mais vulneráveis aos efeitos deletérios da desnutrição precoce. Ademais, a ação isolada da desnutrição revelou que aos P18 todas áreas

analisadas apresentam maior ativação celular. Portanto, a dieta materna com restrição de proteína modifica não apenas a responsividade da via serotoninérgica, mas também o padrão de ativação dos núcleos hipotalâmicos e da rafe. O que nos leva a inferir que organismos desnutridos necessitam de maior recrutamento neuronal, entretanto não foi capaz de modificar o padrão da ingestão alimentar.

Este trabalho demonstrou que o controle hipotalâmico da ingestão alimentar em neonatos é consolidado aos P18, com ênfase para os sensores energéticos AMPK e mTOR e para via orexigênica através da expressão do AgRP. Quando o organismo é desnutrido, há um padrão de hiperativação de núcleos hipotalâmicos em resposta ao jejum, sendo estes hiporesponsivos ao estímulo de um inibidor de recaptação da serotonina. A desnutrição pode promover ajustes sobre mecanismos de controle do comportamento alimentar que perduram até a vida adulta, como observado na literatura. No presente estudo, fornecemos evidências indicando que essa relação pode ser estabelecida e observada ainda em períodos de imaturidade do controle do comportamento alimentar.

REFERÊNCIAS

AKIEDA-ASAI, S.; POLENI, P. E.; DATE, Y. Coinjection of CCK and leptin reduces food intake via increased CART/TRH and reduced AMPK phosphorylation in the hypothalamus. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 11, p. E1284-91, Jun 1 2014. ISSN 1522-1555 (Electronic) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735891> >.

AZIMITIA, E. A. W.-A. P. "Handbook of Experimental Pharmacology Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the SNC. In Baumgarten HG, Gothert M. editors. **Development and Neuroplasticity of Central Serotonergic Neurons.**" 1-39, 1997.

BARRETO-MEDEIROS, J. M. et al. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. **Nutr Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 49-52, Feb 2004. ISSN 1028-415X (Print) 1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085558> >.

BASKIN, D. G. et al. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. **Brain Res**, v. 848, n. 1-2, p. 114-23, Nov 27 1999. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612703> >.

BAXTER, M. G.; MURRAY, E. A. The amygdala and reward. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 7, p. 563-73, Jul 2002. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094212> >.

BECK, B. et al. Unexpected regulation of hypothalamic neuropeptide Y by food deprivation and refeeding in the Zucker rat. **Life Sci**, v. 50, n. 13, p. 923-30, 1992. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1548977> >.

BEG, Z. H.; ALLMANN, D. W.; GIBSON, D. M. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 54, n. 4, p. 1362-9, Oct 15 1973. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4356818> >.

BELLUSCIO, L. M. et al. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. **Physiol Behav**, v. 129, p. 237-54, Apr 22 2014. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607933> >.

BERTHOUD, H. R. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14 Suppl 5, p. 197S-200S, Aug 2006. ISSN 1930-7381 (Print) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021366> >.

BERTHOUD, H. R. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? **Curr Opin Neurobiol**, v. 21, n. 6, p. 888-96, Dec 2011. ISSN 1873-6882 (Electronic) 0959-4388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21981809> >.

BLOUET, C.; SCHWARTZ, G. J. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. **Behav Brain Res**, v. 209, n. 1, p. 1-12, May 1 2010. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035790> >.

BLUMBERG, S. et al. Effects of CCK-8 on independent ingestion and central c-Fos-like immunoreactivity in rats on postnatal days 10 and 11. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2820-8, Nov 2006. ISSN 0196-9781 (Print)0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860903> >.

BLUNDELL, J. E.; HILL, A. J. Serotonergic modulation of the pattern of eating and the profile of hunger-satiety in humans. **Int J Obes**, v. 11 Suppl 3, p. 141-55, 1987. ISSN 0307-0565 (Print)0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3440687> >.

BLUNDELL, J. E.; LATHAM, C. J.; LESHEM, M. B. Differences between the anorexic actions of amphetamine and fenfluramine--possible effects on hunger and satiety. **J Pharm Pharmacol**, v. 28, n. 6, p. 471-7, Jun 1976. ISSN 0022-3573 (Print)0022-3573 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642> >.

BONNIN, A. et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 347-50, Apr 21 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic)0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21512572 >.

BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B. G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. **Int J Dev Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 341-7, Oct 2007. ISSN 0736-5748 (Print)0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706396> >.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. **J Neurosci**, v. 24, n. 11, p. 2797-805, Mar 17 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic)0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028773> >.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. **Clin Genet**, v. 70, n. 4, p. 295-301, Oct 2006. ISSN 0009-9163 (Print)0009-9163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16965320> >.

BRETON, C. et al. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 3, p. E462-72, Mar 2009. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088253> >.

CAPUANO, C. A.; LEIBOWITZ, S. F.; BARR, G. A. Effect of paraventricular injection of neuropeptide Y on milk and water intake of preweanling rats. **Neuropeptides**, v. 24, n. 3, p. 177-82, Mar 1993. ISSN 0143-4179 (Print)0143-4179 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8474636> >.

CARLING, D. AMP-activated protein kinase: balancing the scales. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 87-91, Jan 2005. ISSN 0300-9084 (Print)0300-9084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733742> >.

CAVANAUGH, A. R.; SCHWARTZ, G. J.; BLOUET, C. High-fat feeding impairs nutrient sensing and gut brain integration in the caudomedial nucleus of the solitary tract in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0118888, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25774780> >.

CHAUDHRI, O. B. et al. Gastrointestinal satiety signals. **Annu Rev Physiol**, v. 70, p. 239-55, 2008. ISSN 0066-4278 (Print)0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17937600> >.

CLARET, M. et al. AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. **J Clin Invest**, v. 117, n. 8, p. 2325-36, Aug 2007. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671657> >.

CLIFTON, P. G.; LEE, M. D.; DOURISH, C. T. Similarities in the action of Ro 60-0175, a 5-HT_{2C} receptor agonist and d-fenfluramine on feeding patterns in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 152, n. 3, p. 256-67, Oct 2000. ISSN 0033-3158 (Print)0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105935> >.

COONS, E. E.; LEVAK, M.; MILLER, N. E. Lateral hypothalamus: learning of food-seeking response motivated by electrical stimulation. **Science**, v. 150, n. 3701, p. 1320-1, Dec 3 1965. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5857003> >.

COTA, D.; PROULX, K.; SEELEY, R. J. The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2158-68, May 2007. ISSN 0016-5085 (Print)0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498509> >.

COTA, D. et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 927-30, May 12 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic)0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690869> >.

COUPE, B. et al. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 3, p. R813-24, Sep 2009. ISSN 1522-1490 (Electronic)0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19605764> >.

DA SILVA XAVIER, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 8, p. 4023-8, Apr 11 2000. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760274> >.

DA SILVA XAVIER, G. et al. Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. **Biochem J**, v. 371, n. Pt 3, p. 761-74, May 1 2003. ISSN 0264-6021 (Print)0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589707> >.

DAHLSTROEM, A.; FUXE, K. Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. **Acta Physiol Scand Suppl**, p. SUPPL 232:1-55, 1964. ISSN 0302-2994 (Print)0302-2994 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14229500 >.

DANIEL, P. M. Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. **J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)**, v. 7, p. 1-7, 1976. ISSN 0144-0349 (Print)0144-0349 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1073162> >.

DE VRY, J.; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT(1) and 5-HT(2) receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 3, p. 341-53, May 2000. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781694> >.

DELAHAYE, F. et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 470-5, Feb 2008. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006626> >.

DOCKRAY, G. J. Cholecystokinin. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 19, n. 1, p. 8-12, Feb 2012. ISSN 1752-2978 (Electronic)1752-296X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22157397> >.

DOURISH, C. T. et al. Evidence that blockade of post-synaptic 5-HT1 receptors elicits feeding in satiated rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 97, n. 1, p. 54-8, 1989. ISSN 0033-3158 (Print)0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2496427> >.

DUCA, F. A.; SAKAR, Y.; COVASA, M. The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 10, p. 1663-77, Oct 2013. ISSN 1873-4847 (Electronic)0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041374> >.

ELIAS, C. F. et al. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **J Comp Neurol**, v. 432, n. 1, p. 1-19, Mar 26 2001. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241374> >.

FALLON, S. et al. Food reward-induced neurotransmitter changes in cognitive brain regions. **Neurochem Res**, v. 32, n. 10, p. 1772-82, Oct 2007. ISSN 0364-3190 (Print)0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721820> >.

FOX, S. R.; DENERIS, E. S. Engrailed is required in maturing serotonin neurons to regulate the cytoarchitecture and survival of the dorsal raphe nucleus. **J Neurosci**, v. 32, n. 23, p. 7832-42, Jun 6 2012. ISSN 1529-2401 (Electronic)0270-6474 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22674259 >.

FRAMBES, N. A. et al. 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2 receptor agonists induce differential behavioral responses in preweanling rat pups. **Eur J Pharmacol**, v. 182, n. 1, p. 9-17, Jun 21 1990. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2144825> >.

FUKUSHIMA, A. et al. Sex differences in feeding behavior in rats: the relationship with neuronal activation in the hypothalamus. **Front Neurosci**, v. 9, p. 88, 2015. ISSN 1662-4548 (Print)1662-453X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25870535> >.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 12, p. 1002-12, Dec 2003. ISSN 1471-003X (Print)1471-003X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14618156 >.

GIBSON, E. L. The psychobiology of comfort eating: implications for neuropharmacological interventions. **Behav Pharmacol**, v. 23, n. 5-6, p. 442-60, Sep 2012. ISSN 1473-5849

(Electronic)0955-8810 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22854304> >.

GIL-CAMPOS, M. et al. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. **Br J Nutr**, v. 96, n. 2, p. 201-26, Aug 2006. ISSN 0007-1145 (Print)0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923214> >.

GJERDE, E. et al. Developmental responses of the lateral hypothalamus to leptin in neonatal rats, and its implications for the development of functional connections with the ventral tegmental area. **J Neuroendocrinol**, Dec 26 2015. ISSN 1365-2826 (Electronic)0953-8194 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709016> >.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 235-61, 1998. ISSN 0066-4219 (Print)0066-4219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9509261> >.

GROVE, K. L. et al. Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system. **Neuroscience**, v. 116, n. 2, p. 393-406, 2003. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559095> >.

HAASE, L.; CERF-DUCASTEL, B.; MURPHY, C. Cortical activation in response to pure taste stimuli during the physiological states of hunger and satiety. **Neuroimage**, v. 44, n. 3, p. 1008-21, Feb 1 2009. ISSN 1095-9572 (Electronic)1053-8119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007893> >.

HALFORD, J. C.; BLUNDELL, J. E. The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. **Physiol Behav**, v. 60, n. 3, p. 933-9, Sep 1996. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873272> >.

HALFORD, J. C. et al. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 201-13, Mar 2005. ISSN 1389-4501 (Print)1389-4501 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777190> >.

HALL, W. G.; BRUNO, J. P. Inhibitory controls of ingestion in 6-day-old rat pups. **Physiol Behav**, v. 32, n. 5, p. 831-41, May 1984. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6494288> >.

HALL, W. G.; ROSENBLATT, J. S. Development of nutritional control of food intake in suckling rat pups. **Behav Biol**, v. 24, n. 4, p. 413-27, Dec 1978. ISSN 0091-6773 (Print)0091-6773 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/747582> >.

HAMON M, B. S., EL MESTIKAWY S, GOETZ C (1982). Central serotonin receptors. **Oxford: Blackwell Science**, p. 107-143, 1982.

HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? **Eur J Biochem**, v. 246, n. 2, p. 259-73, Jun 1 1997. ISSN 0014-2956 (Print)0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9208914> >.

HASKELL-LUEVANO, C.; MONCK, E. K. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. **Regul Pept**, v. 99, n. 1, p. 1-7, May 5 2001. ISSN 0167-0115 (Print)0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257308> >.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**, v. 18, n. 16, p. 1926-45, Aug 15 2004. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314020> >.

HEISLER, L. K. et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 609-11, Jul 26 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic)0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142539> >.

HEISLER, L. K. et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. **Neuron**, v. 51, n. 2, p. 239-49, Jul 20 2006. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16846858> >.

HEISLER, L. K.; KANAREK, R. B.; GERSTEIN, A. Fluoxetine decreases fat and protein intakes but not carbohydrate intake in male rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, n. 3, p. 767-73, Nov 1997. ISSN 0091-3057 (Print)0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9329071> >.

HERY, F. et al. Identification and role of serotonin 5-HT1A and 5-HT1B receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons. **J Neurochem**, v. 72, n. 5, p. 1791-801, May 1999. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10217255 >.

HILL, A. J.; MAGSON, L. D.; BLUNDELL, J. E. Hunger and palatability: tracking ratings of subjective experience before, during and after the consumption of preferred and less preferred food. **Appetite**, v. 5, n. 4, p. 361-71, Dec 1984. ISSN 0195-6663 (Print)0195-6663 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6529262> >.

HIRONAKA, S. et al. Feeding-induced c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and dorsal medullary reticular formation in neonatal rats. **Neurosci Lett**, v. 293, n. 3, p. 175-8, Nov 3 2000. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036189> >.

HOUP, K. A.; EPSTEIN, A. N. Ontogeny of controls of food intake in the rat: GI fill and glucoprivation. **Am J Physiol**, v. 225, n. 1, p. 58-66, Jul 1973. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4714411> >.

HUE, L.; RIDER, M. H. The AMP-activated protein kinase: more than an energy sensor. **Essays Biochem**, v. 43, p. 121-37, 2007. ISSN 0071-1365 (Print)0071-1365 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705797> >.

HYPPA, M. Differentiation of the hypothalamic nuclei during ontogenetic development in the rat. **Z Anat Entwicklungsgesch**, v. 129, n. 1, p. 41-52, 1969. ISSN 0044-2232 (Print)0044-2232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5347930> >.

INOKI, K.; GUAN, K. L. Complexity of the TOR signaling network. **Trends Cell Biol**, v. 16, n. 4, p. 206-12, Apr 2006. ISSN 0962-8924 (Print)0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516475> >.

JACOBS, B. L.; FORMAL, C. A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2 Suppl, p. 9S-15S, Aug 1999. ISSN 0893-133X (Print)0006-3223 (Linking). Disponível em: < >

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10432483 >.

JACQZ-AIGRAIN, E.; KOREN, G. Effects of drugs on the fetus. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 10, n. 2, p. 139-47, Apr 2005. ISSN 1744-165X (Print)1744-165X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701579> >.

JEQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. **Physiol Rev**, v. 79, n. 2, p. 451-80, Apr 1999. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221987> >.

JOHANSON, I. B.; HALL, W. G. Appetitive learning in 1-day-old rat pups. **Science**, v. 205, n. 4404, p. 419-21, Jul 27 1979. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/451612> >.

JORGENSEN, H. S. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. **Dan Med Bull**, v. 54, n. 4, p. 266-88, Nov 2007. ISSN 1603-9629 (Electronic)0907-8916 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18208678> >.

KAHN, B. B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab**, v. 1, n. 1, p. 15-25, Jan 2005. ISSN 1550-4131 (Print)1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054041> >.

KELLEY, A. E.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E. A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. **J Comp Neurol**, v. 493, n. 1, p. 72-85, Dec 5 2005. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255002> >.

KENNY, P. J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 664-79, Feb 24 2011. ISSN 1097-4199 (Electronic)0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21338878> >.

KIM, M. S.; LEE, K. U. Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis. **J Mol Med (Berl)**, v. 83, n. 7, p. 514-20, Jul 2005. ISSN 0946-2716 (Print)0946-2716 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806319> >.

KING, R. S. et al. Birthdates and number of neurons in the serotonergic raphe nuclei in the rat with prenatal protein malnutrition. **Nutr Neurosci**, v. 5, n. 6, p. 391-7, Dec 2002. ISSN 1028-415X (Print)1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509068> >.

KIRSTEIN, C. L.; SPEAR, L. P. 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2 receptor agonists induce differential behavioral responses in neonatal rat pups. **Eur J Pharmacol**, v. 150, n. 3, p. 339-45, Jun 10 1988. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2970973> >.

KONTUREK, S. J. et al. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. **J Physiol Pharmacol**, v. 55, n. 1 Pt 2, p. 137-54, Mar 2004. ISSN 0867-5910 (Print)0867-5910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15082874> >.

KOUTCHEROV, Y.; MAI, J. K.; PAXINOS, G. Hypothalamus of the human fetus. **J Chem Neuroanat**, v. 26, n. 4, p. 253-70, Dec 2003. ISSN 0891-0618 (Print)0891-0618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729128> >.

KOWALSKI, T. J. et al. Ontogeny of neuropeptide Y expression in response to deprivation in lean Zucker rat pups. **Am J Physiol**, v. 275, n. 2 Pt 2, p. R466-70, Aug 1998. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688681> >.

KRINGELBACH, M. L. et al. Activation of the human orbitofrontal cortex to a liquid food stimulus is correlated with its subjective pleasantness. **Cereb Cortex**, v. 13, n. 10, p. 1064-71, Oct 2003. ISSN 1047-3211 (Print)1047-3211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967923> >.

LANFUMEY, L.; HAMON, M. Central 5-HT(1A) receptors: regional distribution and functional characteristics. **Nucl Med Biol**, v. 27, n. 5, p. 429-35, Jul 2000. ISSN 0969-8051 (Print)0969-8051 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962246> >.

LAUDER, J. M.; BLOOM, F. E. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. **J Comp Neurol**, v. 155, n. 4, p. 469-81, Jun 15 1974. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4847734> >.

LAUDER, J. M. et al. In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. **Brain Res Bull**, v. 9, n. 1-6, p. 605-25, Jul-Dec 1982. ISSN 0361-9230 (Print)0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6129049> >.

LEE, M. D. et al. 5-HT1B receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin1B agonist CP-94,253. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 164, n. 1, p. 49-60, Oct 2002. ISSN 0033-3158 (Print)0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12373419> >.

LEIBOWITZ, S. F.; ALEXANDER, J. T. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 9, p. 851-64, Nov 1 1998. ISSN 0006-3223 (Print)0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807640> >.

LEIBOWITZ, S. F. et al. Medial hypothalamic serotonin: role in circadian patterns of feeding and macronutrient selection. **Brain Res**, v. 503, n. 1, p. 132-40, Nov 27 1989. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2611645> >.

LEVALLOIS, C. et al. Morphological and morphometric analysis of serotonin-containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: a study of development. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 99, n. 2, p. 243-52, Apr 18 1997. ISSN 0165-3806 (Print)0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125478> >.

LI, C.; CHEN, P.; SMITH, M. S. The acute suckling stimulus induces expression of neuropeptide Y (NPY) in cells in the dorsomedial hypothalamus and increases NPY expression in the arcuate nucleus. **Endocrinology**, v. 139, n. 4, p. 1645-52, Apr 1998. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528945> >.

LIRA, L. A. et al. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 38, p. 23-9, Nov 2014. ISSN 1873-474X (Electronic)0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25102411> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

ISSN 1046-2023 (Print)1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1400-8, Mar 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic)0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18331342> >.

LOPEZ-ALONSO, V. E. et al. The effects of 5-HT1A and 5-HT2C receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. **Neurosci Lett**, v. 416, n. 3, p. 285-8, Apr 18 2007. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324511> >.

LUKOYANOV, N. V.; ANDRADE, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. **Behav Brain Res**, v. 112, n. 1-2, p. 85-97, Jul 2000. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862939> >.

LUPOLI, B. et al. Effect of suckling on the release of oxytocin, prolactin, cortisol, gastrin, cholecystokinin, somatostatin and insulin in dairy cows and their calves. **J Dairy Res**, v. 68, n. 2, p. 175-87, May 2001. ISSN 0022-0299 (Print)0022-0299 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504382> >.

LUTTER, M.; NESTLER, E. J. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. **J Nutr**, v. 139, n. 3, p. 629-32, Mar 2009. ISSN 1541-6100 (Electronic)0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176746> >.

MANJARREZ, G.; CHAGOYA, G.; HERNANDEZ, J. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. **Biol Neonate**, v. 54, n. 4, p. 232-40, 1988. ISSN 0006-3126 (Print)0006-3126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3179377> >.

MANJARREZ, G. et al. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 21, n. 5, p. 283-9, Aug 2003. ISSN 0736-5748 (Print)0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850062> >.

MANN, P. E. et al. The development of POMC gene expression in the medial basal hypothalamus of prepubertal rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 116, n. 1, p. 21-8, Aug 5 1999. ISSN 0165-3806 (Print)0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446343> >.

MANUEL-APOLINAR, L. et al. Fetal malnutrition affects hypothalamic leptin receptor expression after birth in male mice. **Arch Med Res**, v. 41, n. 4, p. 240-5, May 2010. ISSN 1873-5487 (Electronic)0188-4409 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637365> >.

MARTINEZ DE MORENTIN, P. B. et al. Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. **Curr Mol Med**, v. 14, n. 1, p. 3-21, Jan 2014. ISSN 1875-5666 (Electronic)1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24236459> >.

MATOS, R. J. et al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. **Neuroscience**, v. 196, p. 16-24, Nov 24 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic)0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930191> >.

MAURY, E.; RAMSEY, K. M.; BASS, J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. **Circ Res**, v. 106, n. 3, p. 447-62, Feb 19 2010. ISSN 1524-

4571 (Electronic)0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167942> >.

MINOKOSHI, Y. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 569-74, Apr 1 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15058305> >.

MINOKOSHI, Y. et al. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. **Nutrition**, v. 24, n. 9, p. 786-90, Sep 2008. ISSN 0899-9007 (Print)0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725075> >.

MITCHELL, S. E. et al. Leptin receptor gene expression and number in the brain are regulated by leptin level and nutritional status. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 14, p. 3573-85, Jul 15 2009. ISSN 1469-7793 (Electronic)0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19491239> >.

MIYATA, T.; MINAI, Y.; HAGA, M. Association of the suckling-weaning transition with development of the hypothalamic arcuate nucleus neurons in rat pups. **Exp Anim**, v. 58, n. 1, p. 61-6, Jan 2009. ISSN 1881-7122 (Electronic)0007-5124 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151514> >.

MORALES, T. et al. Fos expression induced by milk ingestion in the caudal brainstem of neonatal rats. **Brain Res**, v. 1241, p. 76-83, Nov 19 2008. ISSN 1872-6240 (Electronic)0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18823956> >.

MORAN, T. H. Gut peptides in the control of food intake. **Int J Obes (Lond)**, v. 33 Suppl 1, p. S7-10, Apr 2009. ISSN 1476-5497 (Electronic)0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363513> >.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-128, Spring 1993. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8455820> >.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-83, Jun 2002. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204193> >.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-95, Sep 21 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988703> >.

NAGATA, E. et al. Altered gene expressions of ghrelin, PYY, and CCK in the gastrointestinal tract of the hyperphagic intrauterine growth restriction rat offspring. **Horm Metab Res**, v. 43, n. 3, p. 178-82, Mar 2011. ISSN 1439-4286 (Electronic)0018-5043 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264794> >.

NASLUND, E.; HELLSTROM, P. M. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. **Physiol Behav**, v. 92, n. 1-2, p. 256-62, Sep 10 2007. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582445> >.

NICHOLS, D. E.; NICHOLS, C. D. Serotonin receptors. **Chem Rev**, v. 108, n. 5, p. 1614-41, May 2008. ISSN 1520-6890 (Electronic)0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476671> >.

NOCK, B.; WILLIAMS, C. L.; HALL, W. G. Suckling behavior of the infant rat: modulation by a developing neurotransmitter system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 8, n. 3, p. 277-80, Mar 1978. ISSN 0091-3057 (Print)0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/206914> >.

NOGUEIRA, M. I. et al. A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments. **J Neurosci Methods**, v. 72, n. 1, p. 65-70, Mar 1997. ISSN 0165-0270 (Print)0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9128170> >.

OLUYOMI, A. O. et al. d-Fenfluramine and d-norfenfluramine hypophagias do not require increased hypothalamic 5-hydroxytryptamine release. **Eur J Pharmacol**, v. 264, n. 1, p. 111-5, Oct 13 1994. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7828639> >.

OROZCO-SOLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiol Behav**, v. 96, n. 3, p. 481-92, Mar 2 2009. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100759> >.

OROZCO-SOLIS, R. et al. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13537, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975839> >.

OROZCO-SOLIS, R. et al. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. **Int J Obes (Lond)**, v. 35, n. 7, p. 990-1000, Jul 2011. ISSN 1476-5497 (Electronic)0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060311> >.

PARKER, H. E.; GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. The role of gut endocrine cells in control of metabolism and appetite. **Exp Physiol**, v. 99, n. 9, p. 1116-20, Sep 2014. ISSN 1469-445X (Electronic)0958-0670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210110> >.

PARKER, J. A.; BLOOM, S. R. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 18-30, Jul 2012. ISSN 1873-7064 (Electronic)0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369786> >.

PHIFER, C. B.; LADD, M. D.; HALL, W. G. Effects of hydrational state on ingestion in infant rats: is dehydration the only ingestive stimulus? **Physiol Behav**, v. 49, n. 4, p. 695-9, Apr 1991. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1881971> >.

PIMENTEL, G. D. et al. The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. **Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 171-8, Feb 2013. ISSN 1532-8600 (Electronic)0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898253> >.

PROULX, K.; RICHARD, D.; WALKER, C. D. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4683-92, Dec 2002. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446596> >.

QI, Y. et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. **Nat Med**, v. 10, n. 5, p. 524-9, May 2004. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077108> >.

RAMAMURTHY, S.; RONNETT, G. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Energy-Sensing in the Brain. **Exp Neurobiol**, v. 21, n. 2, p. 52-60, Jun 2012. ISSN 2093-8144 (Electronic)1226-2560 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22792025> >.

RAMON; CAJAL. Histologie Du systeme nerveux de l'homme et des vertebres II. **Malone, Paris**, 1911.

RINAMAN, L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. **Brain Res**, v. 1350, p. 18-34, Sep 2 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic)0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353764> >.

RINAMAN, L. et al. Central c-Fos expression in neonatal and adult rats after subcutaneous injection of hypertonic saline. **Neuroscience**, v. 79, n. 4, p. 1165-75, Aug 1997. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219975> >.

RISTINE, L. A.; SPEAR, L. P. Effects of serotonergic and cholinergic antagonists on suckling behavior of neonatal, infant, and weanling rat pups. **Behav Neural Biol**, v. 41, n. 2, p. 99-126, Jul 1984. ISSN 0163-1047 (Print)0163-1047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6487222> >.

ROCHA, M. L. et al. Undernutrition during early life alters neuropeptide Y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. **Neuroscience**, v. 256, p. 379-91, Jan 3 2014. ISSN 1873-7544 (Electronic)0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183962> >.

RODRIGUES, B. C.; CAVALCANTE, J. C.; ELIAS, C. F. Expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat forebrain during postnatal development. **Neuroscience**, v. 195, p. 201-14, Nov 10 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic)0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903152> >.

ROH, C. et al. Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 2, p. E322-30, Feb 2003. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388166> >.

ROSEN, H.; POLAKIEWICZ, R. Postnatal expression of opioid genes in rat brain. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 46, n. 1, p. 123-9, Mar 1 1989. ISSN 0165-3806 (Print)0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2706766> >.

ROWLAND, N. E.; CARLTON, J. Neurobiology of an anorectic drug: fenfluramine. **Prog Neurobiol**, v. 27, n. 1, p. 13-62, 1986. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3526413> >.

SAHU, A.; KALRA, P. S.; KALRA, S. P. Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. **Peptides**, v. 9, n. 1, p. 83-6, Jan-Feb 1988. ISSN 0196-9781 (Print)0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3362745> >.

SCHLOSS, P.; WILLIAMS, D. C. The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. **J Psychopharmacol**, v. 12, n. 2, p. 115-21, 1998. ISSN 0269-8811 (Print)0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694022> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 6 2000. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766253> >.

SHAH, B. P. et al. MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 36, p. 13193-8, Sep 9 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25157144> >.

SHETTY, P. Malnutrition and Undernutrition. **Medicine**, v. 31, n. 4, p. 5, 2003.

SHIN, A. C.; ZHENG, H.; BERTHOUD, H. R. An expanded view of energy homeostasis: neural integration of metabolic, cognitive, and emotional drives to eat. **Physiol Behav**, v. 97, n. 5, p. 572-80, Jul 14 2009. ISSN 1873-507X (Electronic)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19419661> >.

SIMANSKY, K. J.; NICKLOUS, D. M. Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake. Blockade by the 5-HT(1B) antagonist SB-216641. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 4, p. 681-90, Apr 2002. ISSN 0091-3057 (Print)0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11888559> >.

SINGER, L. K. et al. Novel expression of hypothalamic neuropeptide Y during postnatal development in the rat. **Neuroreport**, v. 11, n. 5, p. 1075-80, Apr 7 2000. ISSN 0959-4965 (Print)0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10790885> >.

SMALL, D. M. Taste representation in the human insula. **Brain Struct Funct**, v. 214, n. 5-6, p. 551-61, Jun 2010. ISSN 1863-2661 (Electronic)1863-2653 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512366> >.

SODERO, A. O.; ORSINGHER, O. A.; RAMIREZ, O. A. Altered serotonergic function of dorsal raphe nucleus in perinatally protein-deprived rats: effects of fluoxetine administration. **Eur J Pharmacol**, v. 532, n. 3, p. 230-5, Feb 27 2006. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472801> >.

SPEAR, L. P.; FRAMBES, N. A.; GOODWIN, G. Low doses of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT increase ingestive behavior in late preweanling and postweanling, but not neonatal rat pups. **Eur J Pharmacol**, v. 203, n. 1, p. 9-15, Oct 2 1991. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1839148> >.

SPEAR, L. P. et al. The 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT increases attachment maintenance but decreases suckling-related intake in 17-18-day-old rat pups. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 47, n. 1, p. 133-9, Jan 1994. ISSN 0091-3057 (Print)0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8115414> >.

SPEAR, L. P.; RISTINE, L. A. Quipazine-induced behavior in neonatal rat pups. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 14, n. 6, p. 831-4, Jun 1981. ISSN 0091-3057 (Print)0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7255519> >.

STARK, R.; ASHLEY, S. E.; ANDREWS, Z. B. AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. **Mol Cell Endocrinol**, v. 366, n. 2, p. 215-23, Feb 25 2013. ISSN 1872-8057 (Electronic)0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789749> >.

SUNDSTROM, E. et al. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 75, n. 1, p. 1-12, Sep 17 1993. ISSN 0165-3806 (Print)0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7900931> >.

SWITHERS, S. E. Do metabolic signals stimulate intake in rat pups? **Physiol Behav**, v. 79, n. 1, p. 71-8, Jun 2003. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818711> >.

TABER, E.; BRODAL, A.; WALBERG, F. The raphe nucleio f the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitetcture and general discussion. **J. Comp. Neurol**, v. 114, n. 161-167, 1960.

TAKAHASHI, H. et al. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. **Brain Dev**, v. 8, n. 4, p. 355-65, 1986. ISSN 0387-7604 (Print)0387-7604 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3541662> >.

TAKASE, L. F.; NOGUEIRA, M. I. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. **Brain Res**, v. 1200, p. 10-8, Mar 20 2008. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18289515> >.

TUNGALAGSUVD, A. et al. The expression of orexigenic and anorexigenic factors in middle-aged female rats that had been subjected to prenatal undernutrition. **Int J Dev Neurosci**, v. 49, p. 1-5, Dec 15 2015. ISSN 1873-474X (Electronic)0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26702900> >.

UGRUMOV, M. V. et al. On the distribution and morpho-functional characteristics of 5-HT-immunoreactive cells in the hypothalamus of fetuses and neonatal rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 46, n. 2, p. 233-41, Apr 1 1989. ISSN 0165-3806 (Print)0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2720956> >.

VALADARES, C. T. et al. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. **Nutr Neurosci**, v. 13, n. 6, p. 274-82, Dec 2010. ISSN 1476-8305 (Electronic)1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040625> >.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 18, n. 2, p. 158-68, Feb 2008. ISSN 1590-3729 (Electronic)0939-4753 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061414> >.

VANDER HAAR, E. et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 316-23, Mar 2007. ISSN 1465-7392 (Print)1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277771> >.

VOIGT, J. P.; FINK, H. Serotonin controlling feeding and satiety. **Behav Brain Res**, v. 277, p. 14-31, Jan 15 2015. ISSN 1872-7549 (Electronic)0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217810> >.

WELLER, A. et al. Preloads of corn oil inhibit independent ingestion on postnatal day 15 in rats. **Physiol Behav**, v. 62, n. 4, p. 871-4, Oct 1997. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284510> >.

WELLER, A.; GISPAN, I. H.; SMITH, G. P. Postingestive inhibitory controls of independent ingestion in 12-day-old rats. **Physiol Behav**, v. 60, n. 2, p. 361-4, Aug 1996. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840892> >.

WELLER, A.; TSITOLOVSKYA, L. The ontogeny of the postingestive inhibitory effect of peptone in rats. **Physiol Behav**, v. 82, n. 1, p. 11-6, Aug 2004. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234583> >.

WELLER, A. et al. Ontogeny of hypertonic preabsorptive inhibitory control of intake in neonatal rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 278, n. 1, p. R44-9, Jan 2000. ISSN 0363-6119 (Print)0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644620> >.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Res Bull**, v. 56, n. 5, p. 479-85, Nov 15 2001. ISSN 0361-9230 (Print)0361-9230 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11750793 >.

WILLIAMS, C. L.; ROSENBLATT, J. S.; HALL, W. G. Inhibition of suckling in weaning-age rats: a possible serotonergic mechanism. **J Comp Physiol Psychol**, v. 93, n. 3, p. 414-29, Jun 1979. ISSN 0021-9940 (Print)0021-9940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/479391> >.

WIRTSCHAFTER, D. The control of ingestive behavior by the median raphe nucleus. **Appetite**, v. 36, n. 1, p. 99-105, Feb 2001. ISSN 0195-6663 (Print)0195-6663 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161350> >.

WRIGHT, D. E. et al. Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 351, n. 3, p. 357-73, Jan 16 1995. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7706547> >.

WYNNE, K. et al. Appetite control. **J Endocrinol**, v. 184, n. 2, p. 291-318, Feb 2005. ISSN 0022-0795 (Print)0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15684339> >.

XU, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 736-42, Jul 2003. ISSN 1097-6256 (Print)1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796784> >.

YAMAMOTO, T. Central mechanisms of roles of taste in reward and eating. **Acta Physiol Hung**, v. 95, n. 2, p. 165-86, Jun 2008. ISSN 0231-424X (Print)0231-424X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18642757> >.

ZHOU, H.; HUANG, S. The complexes of mammalian target of rapamycin. **Curr Protein Pept Sci**, v. 11, n. 6, p. 409-24, Sep 2010. ISSN 1875-5550 (Electronic)1389-2037 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20491627>>.

APÊNDICE

Apêndice A – Artigos publicados em colaboração durante vigência do Doutorado

Int. J. Devl Neuroscience 49 (2016) 50–59



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

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



Low protein diet during gestation and lactation increases food reward seeking but does not modify sucrose taste reactivity in adult female rats



Amanda Alves Marcelino da Silva^{a,d}, Mayara Matias Oliveira^b,
Taisy Cinthia Ferro Cavalcante^{c,e}, Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida^d,
Julliet Araújo de Souza^e, Matilde Cesiana da Silva^f, Sandra Lopes de Souza^{d,g,*}

^a Nursing College—Universidade de Pernambuco—Campus Petrolina-UFPE, Recife, PE, Brazil

^b Postgraduate Genetics, Universidade Federal Pernambuco—UFPE, Recife, PE, Brazil

^c Postgraduate Nutrition, Universidade Federal Pernambuco—UFPE, Recife, PE, Brazil

^d Postgraduate Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Universidade Federal Pernambuco—UFPE, Recife, PE, Brazil

^e Nutrition College—Universidade de Pernambuco—Campus Petrolina-UFPE, Recife, PE, Brazil

^f Nutrition College—Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória—UFPE-CAV, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^g Department of Anatomy, Universidade Federal de Pernambuco—UFPE, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 May 2015
Received in revised form
25 December 2015
Accepted 12 January 2016
Available online 22 January 2016

Keywords:
Low protein diet
Motivation
Taste
c-Fos
Female
Rats

ABSTRACT

Introduction: Nutritional deficiencies during neural development may lead to irreversible changes, even after nutritional rehabilitation, promoting morphological and functional adaptations of structures involved with various behaviours including feeding behaviour. However, the ability of the exposure low protein diet during gestation and lactation to affect the hedonic component of food intake is still poorly understood, especially in females.

Methods: Wistar rats were divided into two groups according to the diet offered to the dams during pregnancy and lactation: control female (CF; diet with 17% protein, $n=7$) and low protein female (LPF; diet with 8% protein, $n=7$). The following parameters were evaluated: (a) body weight during weaning, 30, 45, 60, 75, 90 days of life; (b) standard diet intake from 110 to 132 days of life; (c) fat diet and consumption of simple carbohydrates (HFHS) for 1 h at 145 days of life; (d) incentive runway task 60 days after 82 days of life; (e) taste reactivity at 90 days of life; and (f) neuronal activation in the caudate putamen, amygdala, paraventricular nucleus of the hypothalamus under stimulus HFHS at 145 days of life.

Results: The exposure, a low protein diet during gestation and lactation, decreased the body weight throughout the study period from weaning to 90 days of life. However, there was no significant change in the body weight of low protein females from 110 to 132 days of life compared with the control females. There was an increase in the rate of the search for reward and reduced the latency of the perception of bitter taste. The exposure, a low protein diet during gestation and lactation, also promoted hypophagy in adult females compared with control animals. The low protein female had increased HFHS diet consumption compared with the control. Undernutrition increased neuronal activation in response to HFHS diet consumption compared with female controls in the amygdala and in the caudate putamen.

Conclusion: Females subjected to the exposure, a low protein diet during gestation and lactation, exhibit hypophagy on a standard diet but a higher consumption of a diet rich in lipids and simple carbohydrates. And also were more motivated by the pursuit of reward and reduced latency of the bitter taste reactivity, and increased the number of immunoreactive cells c-fos protein activated in the caudate putamen, amygdala and paraventricular nucleus.

© 2016 Published by Elsevier Ltd. on behalf of ISDN.

* Corresponding author at: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670901, PE, Brazil.
E-mail address: sanlopesufpe@gmail.com (S.L. de Souza).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

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

Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats



Lívia A. Lira^b, Larissa C.A. Almeida^b, Amanda A.M. da Silva^b, Taisy C.F. Cavalcante^c,
Diogo D.C.B. de Melo^b, Juliette A. de Souza^c, Renata C.F. Campina^{a,b},
Sandra L. de Souza^{a,b,c,*}

^a Department of Anatomy, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

^b Postgraduate Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

^c Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2014

Received in revised form 27 July 2014

Accepted 27 July 2014

Keywords:

Perinatal undernutrition

Feeding behaviour

Nucleus of the solitary tract

Rats

Fos protein

ABSTRACT

During the early periods of development, i.e., gestation and lactation, the influences of stimulus such as undernutrition can lead to several behavioural and morphofunctional damages to organs and systems in general, including pathways and structures that control energy balance and feeding behaviour. Although a large body of evidences have shown the effects of this stimulus on structures such as hypothalamus, only few studies have directed their attention to the long-term effects of undernutrition on the nucleus of the solitary tract (NTS). The aim of this study was to investigate the effects of early undernutrition on the NTS and control of food intake in adulthood. Male Wistar rats were divided into two groups according to the diet offered to the dams during gestation and lactation: control group (C, diet containing 17% casein) or isocaloric low-protein group (LP, diet containing 8% casein). On 35 or 180 days, we evaluated the rats' body weight, food intake, behavioural satiety sequence and c-Fos protein expression in the NTS in response to food stimulus. Based on these assessments, it was found that perinatal undernutrition promoted an increase in food intake and the number of activated cells in rostral and, mainly, medial NTS in response to food stimulation in adulthood. These results indicated that the NTS is a structure particularly vulnerable to the influences of nutritional manipulation in the early stages of development with effects on food control in adulthood.

© 2014 Published by Elsevier Ltd. on behalf of ISDN.

BRIEF COMMUNICATION

Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring

Taisy Cinthia Ferro Cavalcante¹, Amanda Alves Marcelino da Silva², Maria Cláudia Alheiros Lira¹, Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida², Ana Patricia Jaques Marques¹, and Elizabeth do Nascimento¹

¹Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife-PE, Brazil and ²Department of Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil

Abstract

This study evaluated the long-term effects of a westernized diet during pregnancy and lactation. Female Wistar rats ($n=12$) were divided into two groups according to their food intake, namely, control (C) or westernized (W) diet, throughout pregnancy/lactation. On the 21st day, the male pups were weaned on a standard diet as follows: Control diet (CC) ($n=8$) and westernized diet in perinatal life followed by control diet post weaning (WC) ($n=8$). The levels of fasting (12 h) serum glucose, triglycerides (TG), and total cholesterol and fraction in the pups were determined. During weaning, the WC group showed 14% greater body weight ($p<0.001$). In the adulthood, the offspring from dams fed on westernized diet showed hyperphagia, hyperinsulinism, hypertriglyceridemia, higher fat visceral weight, higher very-low-density-lipoprotein cholesterol level, decreased high-density-lipoprotein cholesterol level, and altered glucose tolerance test. In conclusion, maternal western-style diet in early life altered long-term food intake, visceral fat pad, insulin, glucose and lipid serum, and increased risk of metabolic disorders.

Keywords

Adulthood, food intake, glucose and lipid profile, rat, western-style diet

History

Received 17 March 2014
Revised 14 July 2014
Accepted 21 July 2014
Published online 1 September 2014

Original research paper

Early physical activity minimizes the adverse effects of a low-energy diet on growth and development parameters

Gisélia de Santana Muniz, Amanda Marcelino Alves da Silva, Taisy Cinthia Ferro Cavalcante, Ana Karla da Silva França, Karla Mônica Ferraz, Elizabeth do Nascimento

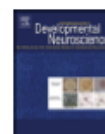
University Federal of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Objectives: The aim of this study was to evaluate the effect of a low-energy diet on rat dams and physical activity in water during the perinatal period on body weight, somatic growth, and neuromotor development. **Methods:** Rat dams were fed with control or low-energy diets from the third gestational week. At 8 days old the litters were either involved or not in aquatic physical activity. The groups were initially divided into normocaloric (C) or low-energy (LE) diets. The study included 52 male pups from primiparous Wistar rats. Exercise in water was carried out with the pups from the age of 8 to 52 days. Four experimental groups were formed: inactive control (IC), active control (AC), inactive low-energy (ILE), and active low-energy (ALE). Somatic growth (tail length (TL), lateral-lateral axis of the skull (LLAS), anterior-posterior axis of the skull (APAS), and longitudinal axis (LA)), maturation of reflexes and neuromotor development of pup locomotion were analyzed along with a biochemical profile.

Results: During lactation the body weight range (%) was lower for ILE compared with IC (38%, $P<0.05$), as ALE body weight gain was lower (29%, $P<0.05$) compared with AC and bigger (17%, $P<0.05$) compared with ILE. At 21st day reduced body weight was observed in LE diet groups (IC = 48.62 ± 1.36 g; AC = 48.30 ± 1.03 g; ILE = 30.49 ± 1.60 g; ALE = 39.38 ± 1.06 g, $P<0.05$). Compared with control diet, the LE diet delayed somatic growth of pups from 2nd week to end lactation, but the early physical activity in LE group improved some parameters of somatic growth (TL: IC = 68.87 ± 1.00 mm, AC = 68.80 ± 1.10 mm, ILE = 60.21 ± 1.14 mm, ALE = 64.61 ± 0.55 mm; LA: IC = 113.21 ± 1.73 mm, AC = 113.33 ± 1.37 mm, ILE = 99.40 ± 1.67 mm, ALE = 106.76 ± 0.79 mm; APAS: IC = 37.10 ± 0.32 mm, AC = 37.18 ± 0.23 mm, ILE = 34.11 ± 0.33 mm, ALE = 35.84 ± 0.30 mm; LLAS: IC = 18.71 ± 0.24 mm, AC = 19.00 ± 0.16 mm, ILE = 17.10 ± 0.19 mm, ALE = 17.87 ± 0.11 mm, $P<0.05$) and reflex ontogeny. Nevertheless, fewer changes were observed in locomotor activity ($P>0.05$). At 60 days old, the food intake and measures of murinometrics did not differ among groups, but they had lower glucose levels ILE (IC = 4.14 ± 0.23 mmol/l, AC = 3.70 ± 0.22 mmol/l, ILE = 3.38 ± 0.20 mmol/l, ALE = 4.17 ± 0.09 mmol/l, $P<0.05$).

Conclusion: Taken together, we suggest that physical activity in water acts as a beneficial factor in LE diets of dams during the perinatal period. Further study is necessary to investigate the role of physical activity for adaptation against adverse nutritional stimuli.

Keywords: Growth somatic, Development plasticity, Low-energy diet, Physical activity



Perinatal undernutrition stimulates seeking food reward



Amanda Alves Marcelino da Silva^a, Tássia Karin Ferreira Borba^b, Lívia de Almeida Lira^b,
Taisy Cinthia Ferro Cavalcante^a, Manuela Figueiroa Lyra de Freitas^d,
Carol Gois Leandro^{a,c}, Elizabeth do Nascimento^{a,d}, Sandra Lopes de Souza^{a,*}

^a Postgraduate Nutrition, Universidade Federal Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

^b Postgraduate Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Universidade Federal Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

^c Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^d Department of Anatomy, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2012

Received in revised form 6 April 2013

Accepted 2 May 2013

Keywords:

Feeding behavior

Motivation

Rats

Protein c-Fos

Low-protein diet

ABSTRACT

Experiments in animals have revealed that perinatal nutritional restriction, which manifests in adulthood, increases food intake and preference for palatable foods. Considering this, we aimed to evaluate the effects of perinatal malnutrition on hedonic control of feeding behavior. In this study, we divided Wistar rats into two groups according to the diet provided to their mothers during pregnancy and lactation: the control group (diet with 17% casein) and low-protein group (diet with 8% casein). We assessed the animals' motivational behavior in adulthood by giving them a stimulus of food reward. We also assessed their neuronal activation triggered by the stimulus of palatable food using Fos protein labeling of neurons activated in the caudate putamen, paraventricular, dorsomedial, ventromedial, and lateral hypothalamic nuclei and amygdala. Evaluation of body weight in malnourished animals showed reduction from the 6th day of life until adulthood. Analysis of feeding behavior revealed that these animals were more motivated by food reward, but they had delays during learning of the task. This finding correlated with the number of c-Fos-immunoreactive neurons, which indicated that malnourished animals had an increase in the number of neurons activated in response to the palatable diet, especially in the amygdala and caudate putamen. The study therefore confirmed our hypothesis that early nutritional insults promote changes in encephalic control mechanisms, especially those related to food intake and search for reward.

© 2013 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period

Taisy Cinthia Ferro Cavalcante · Jennyffer Mayara Lima da Silva · Amanda Alves da Marcelino da Silva · Gisélia Santana Muniz · Laércio Marques da Luz Neto · Sandra Lopes de Souza · Raul Manhães de Castro · Karla Mônica Ferraz · Elizabeth do Nascimento

Received: 31 January 2013 / Accepted: 13 August 2013 / Published online: 18 September 2013
 © AOCS 2013

Abstract This study evaluates the effects of a westernized diet during the perinatal period on the maternal performance and growth and development of rat offspring. Female Wistar rats were fed with either a control (C) diet, with casein as the protein source or a westernized (W) diet, during pregnancy and lactation. The pups were divided, eight per group, into the same diet groups as their dams. During lactation, the body weight (day 1, $W = 6.85 \pm 0.62$ g, $C = 5.81 \pm 0.49$, $p < 0.05$; day 21, $W = 55.42 \pm 3.78$, $C = 47.75 \pm 3.45$, $p < 0.001$) and somatic growth (body length day 1, $W = 53.24 \pm 2.16$, $C = 50.641 \pm 1.79$, $p < 0.05$; day 21, $W = 124.8$, $C = 119.903 \pm 3.71$, $p < 0.001$) in the male offspring showed significant differences among the groups. The physical appearance and reflex maturation showed differences between day 1 and day 3. With the westernized diet, during the perinatal period, no alterations in maternal weight gain, gestation or performance were observed; however, changes in the coefficients of feed efficiency and

energy during lactation were noted. Besides, blood glucose was found to be elevated at the end of lactation ($C = 3.67 \pm 0.35$ mmol/l, $W = 5.20 \pm 0.49$ mmol/l). At 21 days, the male pups from the dams on the westernized diet were 15 % heavier, and the maturation of the neural reflexes and physical characteristics were found to occur earlier. Therefore, the consumption of a westernized diet during the perinatal period was independent of maternal energy intake, and influenced the growth and development of offspring.

Keywords Gestation · Lactation · Western diet · Neuro-development · Somatic growth · Rats

Abbreviations

AIN	American Institute of Nutrition
BCAE	Brazilian college of animal experimentation
CNS	Central nervous system
EE	Energy efficiency
EO	Eye opening
FG	Fasting glucose
FC	Feed conversion
LEN	Laboratory of experimental nutrition NAIDE teodosio
LI	Eruption of lower incisors
LS	Eruption superior incisors
OE	Opening of the ear
OEC	Opening of the ear canal
SFB	Survey familiar budget
SWG	Specific rate of weight gain
TC	Total cholesterol
TAG	Triacylglyceride(s)
UFPE	Federal University of Pernambuco
WGCC	Weight gain per calorie consumption
WG	Weight gain

T. C. Ferro Cavalcante · J. M. Lima da Silva · G. S. Muniz · L. M. da Luz Neto · S. Lopes de Souza · R. Manhães de Castro · K. M. Ferraz · E. do Nascimento (✉)
 Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, UFPE, Rua Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil
 e-mail: nlizbeth@gmail.com

A. A. da Marcelino da Silva · S. Lopes de Souza · R. Manhães de Castro
 Department of Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, UFPE, Recife, PE, Brazil

S. Lopes de Souza
 Department of Anatomy, UFPE, Recife, PE, Brazil

K. M. Ferraz
 Department of Physiotherapy, UFPE, Recife, PE, Brazil

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 16 de outubro de 2012.

Ofício nº 489/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Sandra Lopes de Souza**
Departamento de Anatomia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.026104/2012-16

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Ontogênese dos mecanismos de controle do comportamento alimentar regulados pelo sistema serotoninérgico em ratos submetidos à desnutrição perinatal”**.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de Nutrição - UFPE;
Animais: ratos Wistar; Sexo: machos e fêmeas; Número
de animais previsto no protocolo: 288

RECEBIDO EM: 19 / 11 / 2012
NOME: TÁBY CÍNTIA FERRO CAVALCANTE
ASSINATURA:

Táby Ferro Cavalcante

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen
Profª. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

Anexo B – Comprovante de Submissão do Artigo 1




[author guidelines](#)
[logout](#)

[submit a new manuscript](#)

Welcome Dr. Sandra Lopes de Souza

Dr. Sandra Lopes de Souza
FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO
RECIFE
Brazil

Email 1: sanlopesufpe@gmail.com
ORCID interface is temporarily disabled
[edit contact information](#)

Editorial Office Phone: +41 61 306 1424
Editorial Office Email: dne@karger.com

Click on  and  to view and hide list(s) below:

MANUSCRIPTS AS CORRESPONDING AUTHOR



Manuscript History (1 manuscript)

201601004 Revision 0 HYPOTHALAMIC PEPTIDE AND NUTRIENT SENSOR...
Submitted: 29/01/2016 Current Status: Abbreviated Ms

Dear Taisy Ferro Cavalcante:

Dr. SANDRA LOPES DE SOUZA has submitted a manuscript entitled "HYPOTHALAMIC PEPTIDE AND NUTRIENT SENSORS GENE EXPRESSION IN THE HYPOTHALAMUS OF NEONATAL RAT", in which you are listed as co-author, to "Developmental Neuroscience".

The submission will now be checked by the editorial office, and Dr. SANDRA LOPES DE SOUZA will receive a confirmation mail from the editorial office soon.

With kind regards,

Editorial Office

Anexo C – Comprovante de Submissão do Artigo 2

ees.elsevier.com/phb/default.asp?acw=f1b1d76acf6e2519d9b9bb-301fec49592aa53e7c%24%7CEA5A206739D5002C444C6AC01793C459C1FA3FF9405A9FE6D7

PHYSIOLOGY & BEHAVIOR

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Submissions Being Processed for Author Sandra Lopes Lopes de Souza, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail		EFFECTS OF PERINATAL PROTEIN MALNUTRITION AND FENFLURAMINE ACTION ON FOOD INTAKE AND NEURONAL ACTIVATION IN THE HYPOTHALAMUS AND RAPHE NUCLEI OF NEONATE RATS	Feb 15, 2016	Feb 15, 2016	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Dear Dr. Taisy Ferro Cavalcante,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Physiology & Behavior

Corresponding Author: Sandra Lopes de Souza

Co-Authors: Taisy C Ferro Cavalcante, Master; Amanda A Marcelino da Silva, Dr; Larissa C Amaral Almeida, Master; Renata C Farias Campina, Dr; Elizabeth d Nascimento, Dr;

Title: EFFECTS OF PERINATAL PROTEIN MALNUTRITION AND FENFLURAMINE ACTION ON FOOD INTAKE AND NEURONAL ACTIVATION IN THE HYPOTHALAMUS AND RAPHE NUCLEI OF NEONATE RATS

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at sanlopesufpe@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/phb/l.asp?i=92006&l=EXHNUE8Z>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Physiology & Behavior