

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

JULLIET ARAÚJO DE SOUZA

**ESTRESSE PERINATAL: efeitos sobre o comportamento alimentar e
sistemas de monoaminas cerebrais**

**Recife
2018**

JULLIET ARAÚJO DE SOUZA

**ESTRESSE PERINATAL: efeitos sobre o comportamento alimentar e
sistemas de monoaminas cerebrais**

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

Orientadora: Prof^a Dra Sandra Lopes de Souza

Co-orientadora: Prof^a Dra Matilde Cesiana da Silva

**Recife
2018**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S729e Souza, Julliet Araújo de.

Estresse perinatal: efeitos sobre o comportamento alimentar e sistemas de monoaminas cerebrais / Julliet Araújo de Souza. – 2018. 88 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Lactação. 2. Comportamento alimentar. 3. Serotonina. 4. Dopamina. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-242)

JULLIET ARAÚJO DE SOUZA

ESTRESSE PERINATAL: efeitos sobre o comportamento alimentar e sistemas de monoaminas cerebrais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição, área de bases experimentais.

Aprovada pela banca em 01 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dra. Sandra Lopes de Souza - UFPE

Prof^o Dr. Marcelo Moraes Valença - UFPE

Prof^a Dra. Rhowena Jane Barbosa de Matos – UFPE/CAV

Prof^a Dra. Lisiane dos Santos Oliveira – UFPE/CAV

Prof^a Dra. Amanda Alves Marcelino da Silva - UPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé em Jesus, a qual cresce em mim a cada dia e me concede renovo na caminhada diária, certeza de que tudo coopera para o meu bem, calma para descansar quando não há o que fazer, força para mudar o que está ao meu alcance e sabedoria para distinguir entre uma situação e outra. Nessa caminhada as pessoas são muito importantes, mas você é essencial.

Aos meus pais, Paulo e Fátima, aos quais amo imensamente. De todas as coisas que poderiam ter me dado, a certeza de que sou amada é a maior e melhor. Agradeço por esse amor que me afirma, me acalma, me ajuda, me acompanha, me apoia e me dá liberdade. Não há livre-arbítrio na escolha dos pais, mas se esta fosse minha responsabilidade eu não poderia ter escolhido melhor. Agradeço a dedicação desinteressada, o apoio e incentivo em tudo que faço, a mão amiga, os conselhos sábios e todo o cuidado demonstrado nas pequenas e grandes decisões que tomam ao meu favor.

Aos meus irmãos, Paulo e Rennan, meus verdadeiros amigos. Agradeço pelo apoio técnico na execução dos meus experimentos e pelo apoio demonstrado nas palavras encorajadoras, no ombro amigo, nos momentos de diversão, no abrir mão de algumas coisas em meu benefício e no estar presente. Amo vocês.

Aos meus parentes, tios, avós, primos e cunhada. Agradeço, pois recebo de vocês apoio semelhante àquele que recebo dos meus pais e irmãos e isso me alegra, incentiva, encoraja e dá a certeza de que possuo amigos com os quais posso contar em todos os momentos.

Aos amigos da Igreja Batista Emanuel, minha segunda família. Agradeço todo encorajamento, assistência e presença em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, a prof^a Sandra Lopes de Souza. Agradeço pelo comprometimento com minha formação científica desde o primeiro período de graduação, pelas sábias palavras de incentivo e orientação sempre proferidas com respeito, pela ajuda na execução dos experimentos e pelos vários bons exemplos demonstrados ao longo desses dez anos, exemplo de dedicação ao que faz, compromisso com a justiça, honestidade, empatia, solidariedade e excelência na pesquisa científica.

À minha co-orientadora Matilde Cesiana da Silva. Agradeço pelo acompanhamento constante em todas as etapas deste projeto, pela ajuda na execução dos experimentos, pelo exemplo de comprometimento demonstrado desde o início da nossa caminhada durante a minha graduação e por todo incentivo a mim direcionado.

Aos amigos do grupo de pesquisa. A Amanda e Taisy pelos ensinamentos como pessoas mais experientes e pela disponibilidade em compartilhar. A Larissa pelo auxílio frequente, pelas interessantes discussões científicas e por todas as gentis palavras de incentivo. A Renata por encontrar tempo para colaborar na execução dos experimentos sempre que solicitada. A Gabriel pela ajuda na realização dos experimentos e no deslocamento e pelas boas discussões científicas. A Rhowena pelo apoio técnico na realização de algumas análises e pelas ricas discussões

científicas. Aos que já concluíram os trabalhos no laboratório, mas contribuíram em algum momento da minha jornada científica, e àqueles que estão chegando, Livia, Isa, Diogo e Mayara.

Aos estagiários que passaram e aos que permaneceram, Fernanda, Luana e Felipe. Agradeço a ajuda na execução de todos os experimentos, e na manutenção das “condições padrão de biotério”. É um trabalho árduo, mas vocês o tornaram menos laborioso.

Aos estagiários que, embora não estivessem diretamente envolvidos neste projeto, sempre ajudavam nos momentos de maior necessidade, Paula, Bruna, Consuelo, Heloísa e Gabriel.

Aos professores da PósNutri pelo comprometimento e por todos os ensinamentos que contribuíram para a minha formação científica.

À PósNutri, Neci, Cecília e professora Elizabeth Nascimento pelo incentivo frequente e pelo exemplo de dedicação e competência na execução de suas funções.

Aos funcionários da instituição que nos auxiliam diariamente.

À Universidade Federal de Pernambuco e às instituições de fomento à pesquisa, FACEPE e CNPq, por viabilizarem a realização desta pesquisa.

“O temor do Senhor é o princípio da
sabedoria.” (A BÍBLIA, 2008)

RESUMO

Distúrbios do comportamento alimentar têm se tornado um fardo para a saúde em todo o mundo. Eventos estressores no início da vida têm sido associados com o desenvolvimento desses distúrbios. Estudos em roedores têm demonstrado que a separação materna entre mães e filhotes durante as primeiras duas semanas de vida é um evento traumático que impacta o comportamento alimentar e sistemas de neurotransmissores na vida adulta. Assim, o presente trabalho objetivou investigar, em ratos, machos e fêmeas, os efeitos da separação materna na lactação sobre parâmetros do comportamento alimentar homeostático e hedônico. Os animais foram separados de suas mães, diariamente, durante as duas primeiras semanas de vida por 3 ou 6h, caracterizando os grupos controle (C) e separado (S) e os parâmetros avaliados foram distribuídos em 3 experimentos. No experimento 1 foram avaliados, em machos, o consumo alimentar após estresse, a preferência alimentar segundo a fase de luminosidade, a ansiedade experimental, o consumo alimentar de 24h e em resposta à fluoxetina. No experimento 2 foram avaliados, em fêmeas, o consumo alimentar de 24h, a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) e a expressão gênica dos receptores serotoninérgicos *5ht1b* e *5ht2c* e do transportador (*Sert*). No experimento 3 foram avaliados, em machos e fêmeas, separados na fase clara ou escura, a ingestão de dieta palatável e a expressão gênica dos receptores dopaminérgicos *Drd1a* e *Drd2a*. Os resultados obtidos no experimento 1 demonstram que a separação materna aumenta o consumo de alimento palatável após estresse agudo (C (Dia3): $0,59 \pm 0,49$ vs S (Dia 3): $1,09 \pm 0,56$, $p < 0,05$) e diminui a ingestão de dieta padrão durante o estresse crônico (Dia 19: C: $26,73 \pm 4,20$ vs S: $22,20 \pm 2,94$, $p < 0,05$), aumenta a preferência por uma dieta palatável na fase escura no período de adaptação a esta (C: $22,48 \pm 15,97$ vs S: $33,99 \pm 10,09$, $n=12-14$, $p < 0,05$), aumenta a ansiedade no labirinto em cruz elevado (tempo nos braços abertos - C: $75,07 \pm 32,58$ vs S: $24 \pm 29,98$, $p < 0,001$) e promove resistência à ação anorética da fluoxetina (S (Jejum): $1,58 \pm 0,27$ vs S(Jejum+Fluox): $1,28 \pm 0,5$). No experimento 2 foi demonstrado que a separação materna antecipa o ponto de saciedade em fêmeas aos 365 dias de vida associado à menor ingestão alimentar (C: $5.11 \pm 1,15$ vs S: 2.42 ± 0.85 , $p < 0,01$), menor duração (minutos) (C: $19.38 \pm 4,5$ vs S: $10.31 \pm 3,95$, $p < 0,001$) e tamanho da refeição (Kcal/Kg peso corporal) (C: 56.19 ± 14.59 vs S: 28.80 ± 10.78 , $p < 0,05$) e maior expressão do *5ht1b* (C: $1,00 \pm 0,11$ vs S: $1,96 \pm 0,40$). No experimento 3 foi demonstrado que a separação materna aumenta o consumo de dieta palatável em ambos os sexos, independente da fase

de luminosidade em que a separação ocorre, mas promove aumento da expressão do *Drd1a* e do *Drd2a* apenas em machos separados na fase escura (dados publicados). Assim, pode-se concluir que a separação materna prejudica o comportamento alimentar em longo prazo e que essas alterações comportamentais estão associadas à hiperexpressão de receptores de monoaminas cerebrais.

Palavras-chave: Lactação. Comportamento alimentar. Serotonina. Dopamina.

ABSTRACT

Eating disorders have become a burden to health around the world. Stressful events in early life have been associated with the development of these disorders. Studies in rodents have shown that maternal separation between mothers and offspring during the first two weeks of life is a traumatic event that has impacts on eating behavior and neurotransmitter systems in adulthood. Thus, the present work aimed to investigate, in rats, males and females, the effects of maternal separation on lactation on parameters of the homeostatic and hedonic eating behavior. The animals were separated from their mothers daily during the first two weeks of life for 3 or 6 hours, characterizing the control (C) and separated (S) groups and the evaluated parameters were distributed in 3 experiments. In experiment 1, food consumption after stress, food preference according to the luminosity phase, experimental anxiety, food consumption of 24 hours and in response to fluoxetine were evaluated in males. In the experiment 2, 24 h food consumption, the Behavioral Satiety Sequence (BSS) and the gene expression of the serotonergic receptors *5ht1b* and *5ht2c* and the transporter (*Sert*) were evaluated in females. In experiment 3 the palatable dietary intake and the gene expression of the *Drd1a* and *Drd2a* dopamine receptors were evaluated in males and females, separated in the light or dark phase. The results obtained in experiment 1 demonstrate that maternal separation increases the consumption of palatable food after acute stress (C (Dia3): $0,59 \pm 0,49$ vs S (Dia 3) and decreases the standard diet intake during chronic stress (Dia 19: C: $26,73 \pm 4,20$ vs S: $22,20 \pm 2,94$, $p < 0,05$), increases the preference for a palatable diet in the dark phase in its period of adaptation (C: $22,48 \pm 15,97$ vs S: $33,99 \pm 10,09$, $n=12-14$, $p < 0,05$), increases anxiety in the elevated plus maze (time spent in the open arms - C: $75,07 \pm 32,58$ vs S: $24 \pm 29,98$, $p < 0,001$) and promotes resistance to the anorectic action of fluoxetine (S (Fasting): $1,58 \pm 0,27$ vs S (Fasting+Fluox): $1,28 \pm 0,5$). In the experiment 2, it was shown that maternal separation anticipates the satiety point in females at 365 days of life associated to lower food intake (C: $5.11 \pm 1,15$ vs S: 2.42 ± 0.85 , $p < 0,01$), shorter duration of meal (minutes) (C: $19.38 \pm 4,5$ vs S: $10.31 \pm 3,95$, $p < 0,001$) and meal size (Kcal / kg body weight) (C: 56.19 ± 14.59 vs S: 28.80 ± 10.78 , $p < 0,05$) and higher expression of *5ht1b* (C: $1,00 \pm 0,11$ vs S: $1,96 \pm 0,40$). In the experiment 3, it was shown that maternal separation increases palatable dietary intake in both sexes, regardless of the luminosity phase in which the separation occurs, but it promotes an increase in the expression of *Drd1a* and *Drd2a*

only in males separated in the dark phase (data published). Thus, it can be concluded that maternal separation impairs long-term eating behavior and that these behavioral changes are associated with overexpression of brain monoamine receptors.

Key words: Lactation. Feeding behavior. Serotonin. Dopamine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3	HIPÓTESE.....	29
4	OBJETIVOS.....	30
4.1	Geral.....	30
4.2	Específicos.....	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1	Animais.....	31
5.2	Separação materna e Formação dos grupos experimentais.....	31
5.3	Experimento 1.....	32
5.3.1	Peso corporal.....	32
5.3.2	Consumo alimentar após estresse alimentar agudo ou crônico.....	32
5.3.3	Preferência alimentar segundo a fase de luminosidade.....	33
5.3.4	Ansiedade experimental.....	33
5.3.5	Consumo alimentar de 24h.....	34
5.3.6	Consumo alimentar em resposta à fluoxetina.....	34
5.4	Experimento 2.....	35
5.4.1	Consumo alimentar de 24h.....	35
5.4.2	Sequência Comportamental de Satedade (SCS).....	35
5.4.3	Eutanásia e obtenção do hipotálamo.....	36
5.4.4	Análise da expressão gênica.....	36
5.5	Análise estatística.....	37
5.6	Experimento 3.....	38
6	RESULTADOS.....	39
7	DISCUSSÃO.....	52
8	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A - ARTIGO.....	84

1 INTRODUÇÃO

Dentre todos os distúrbios comportamentais, os do comportamento alimentar têm se tornado um fardo mundial para a área de saúde (ERSKINE *et al.*, 2016). Fatores ambientais figuram entre um dos principais contribuintes para o desenvolvimento dessas desordens. Particularmente, experiências adversas no início da vida, como abuso, divórcio parental ou luto têm sido referidos por esses pacientes (IWASAKI e INOUE, 2015). Esse período inicial do desenvolvimento é crítico para o estabelecimento das bases neurais do comportamento alimentar (GRANADO *et al.*, 2012) e compreende a gestação, a lactação e a primeira infância (CARLSON *et al.*, 2007).

Nesse período crítico o organismo é influenciado pelas experiências ambientais de maneira a adaptar a sua rota de desenvolvimento baseado nessas experiências. As doenças podem aparecer devido à incompatibilidade entre a previsão e a realidade, hipótese sustentada pela área de estudo denominada Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD) (GLUCKMAN e HANSON, 2004). O estresse configura como um desses eventos que acometem o organismo em desenvolvimento com consequências morfofuncionais deletérias na vida adulta (LIRA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2017).

Em modelos animais o estresse precoce tem sido realizado pela separação periódica entre mães e filhotes no período de lactação. Fatores como duração, frequência e dias de separação variam entre os estudos e influenciam os resultados observados (HANCOCK e GRANT, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2017). O protocolo mais comum é a separação por 180 minutos diariamente durante as primeiras duas semanas de vida do animal (HANCOCK e GRANT, 2009). A ausência da mãe no período neonatal está associada ao desenvolvimento de preferência por dieta palatável (MANIAM e MORRIS, 2010), hiperfagia (RYU *et al.*, 2009) e saciedade antecipada (DA SILVA *et al.*, 2014), ou seja, distúrbios do comportamento alimentar em longo prazo.

Essas consequências comportamentais parecem ser influenciadas por alterações dos sistemas de monoaminas cerebrais, como os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (WOMERSLEY *et al.*, 2011; OHTA *et al.*, 2014). O estresse por separação materna esteve associado a prejuízos na atividade do transportador de dopamina (WOMERSLEY *et al.*, 2011) e aumento na expressão de

receptores dopaminérgicos em áreas cerebrais como hipocampo e Área Tegmentar Ventral (VTA) (PLOJ *et al.*, 2003). Ademais, diminuição na expressão do receptor serotoninérgico 5HT1A no hipocampo e córtex pré-frontal medial (mPFC) e do 5HT2C no mPFC têm sido reportadas (OHTA *et al.*, 2014).

Diante do exposto torna-se essencial compreender os mecanismos subjacentes às alterações do comportamento alimentar observados nesse modelo de estresse precoce. Vale salientar que esse é um comportamento complexo e não deve ser avaliado de forma simplista. Fatores sociais, idade, momento do dia dentre outros fatores afetam a ingestão e a saciedade (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Estudos em animais oferecem a oportunidade de avaliar o comportamento alimentar em seus diferentes aspectos os quais incluem a motivação para o consumo, a frequência de refeições, os resultados da manipulação farmacológica cerebral sobre a ingestão ou a saciedade, a associação do estresse com a ingestão alimentar, dentre outros. Portanto, o presente trabalho se propôs a investigar os efeitos do estresse por separação materna sobre o comportamento alimentar e os sistemas de monoaminas cerebrais.

Este estudo produzirá três artigos científicos. O primeiro encontra-se publicado na “Appetite” sob o título “Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males”. O segundo artigo original encontra-se submetido na “Psychoneuroendocrinology” e abordou os efeitos da separação materna sobre parâmetros do comportamento alimentar em fêmeas, tendo como título “Fluoxetine-like phenotype in maternally separated female rats is associated with 5HT1B serotonin receptor hyperexpression”. O terceiro artigo será elaborado e abordará os efeitos da separação materna sobre vários parâmetros do comportamento alimentar de ratos adultos.

Os resultados do presente trabalho, indicando os efeitos tardios do estresse por separação materna sobre o comportamento alimentar ressaltam a importância dos cuidados com o binômio mãe-filho. A constatação de efeitos possivelmente prejudiciais provocados pela separação materna em estudos experimentais serve de base para as pesquisas epidemiológicas e clínicas e fortalecem iniciativas que promovem o contato dos neonatos com suas mães de forma contínua e reforçam a importância da lactação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Estresse

O estresse pode ser definido como uma resposta do organismo a qualquer desvio da homeostase, causado por um agente estressor. Esse agente pode ser de natureza física, como a perda sanguínea ou a infecção, ou psicológica, por exemplo, a perda de controle (BAUM *et al.*, 1986; PRICE *et al.*, 1996; THRIVIKRAMAN *et al.*, 2000). Informações relacionadas ao agente estressor são enviadas ao encéfalo a partir de todos os principais sistemas sensoriais (YILMAZ e MEISTER, 2013; KONDOH *et al.*, 2016). O encéfalo, então, recruta os efetores responsáveis pela geração da resposta fisiológica ao estresse. A resposta imediata é de natureza neural e efetuada pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Este provoca rápidas alterações fisiológicas através da inervação de órgãos-alvo (GAO *et al.*, 2016; KORIM *et al.*, 2016). Sua ativação diminui depressa resultando em respostas de curta duração. A resposta mais tardia é de natureza neuroendócrina e efetuada pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), o qual resulta na elevação dos glicocorticoides circulantes (cortisol em humanos e corticosterona em ratos). Esta garante um episódio secretório prolongado e amplificado (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

O Sistema Nervoso Autônomo

O SNA é composto de duas partes, simpático e parassimpático. Ambas as partes possuem neurônios pré-ganglionares e pós-ganglionares, estando os pré-ganglionares situados no Sistema Nervoso Central (SNC) e os pós-ganglionares fora do SNC. Os neurônios pré-ganglionares do componente simpático situam-se na medula espinal, na sua porção toracolombar. Os pré-ganglionares do componente parassimpático situam-se tanto na medula, na sua porção sacral, quanto no encéfalo (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). Os neurônios pré-ganglionares dos componentes simpático e parassimpático são principalmente colinérgicos, enquanto os pós-ganglionares diferem, sendo colinérgicos para o componente parassimpático e noradrenérgicos para o componente simpático. Os neurônios pré-ganglionares simpáticos projetam-se para os gânglios paravertebrais os quais projetam-se para os órgãos-alvo. Os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos projetam-se para gânglios situados próximos aos órgãos-alvo. A inervação pós-ganglionar do componente simpático ainda contribui para a geração de uma resposta humoral, a liberação de adrenalina a partir das células cromafins da medula da adrenal. A

ativação simpática provoca respostas que habilitam o indivíduo a lutar ou fugir do agente estressor. Em geral, essa resposta aumenta os níveis circulantes de adrenalina e noradrenalina, aumenta a frequência cardíaca, promove vasoconstrição periférica e mobiliza substratos energéticos. O componente parassimpático, geralmente, apresenta ações opostas ao componente simpático (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

O eixo HPA

A exposição a um estressor também ativa neurônios no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) promovendo a liberação de Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) no sistema porta hipofisário e é o principal regulador da secreção de Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária anterior (VALE *et al.*, 1983). Essa regulação se dá pela ação sobre os receptores do tipo 1 para o hormônio (CRH-R1) (TIMPL *et al.*, 1998). O hormônio Arginina/Vasopressina (AVP) armazenado e liberado pela neuro-hipófise, age potencializando a ação do CRH, mas com pouca ação de secretagogo por si (VALE *et al.*, 1983; YOUNG, 1988). O ACTH liberado pela pituitária anterior age sobre o córtex da glândula adrenal regulando a liberação de glicocorticoides pela zona fasciculada (MARZOUK *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 2010).

Os glicocorticoides são os efetores finais do eixo HPA (CHANG *et al.*, 2010). Todas as células possuem receptores para os glicocorticoides (KING, 2016) os quais se ligam aos receptores de mineralocorticoides e aos receptores clássicos de glicocorticoides (REUL e DE KLOET, 1985). Estes possuem menor afinidade pelo hormônio de maneira que são ativados mais tarde e por níveis elevados do hormônio, aqueles possuem maior afinidade e são ativados mais cedo por baixos níveis de glicocorticoides (REUL e DE KLOET, 1985). O receptor clássico encontra-se no citosol de neurônios, células gliais e pituitárias (SAPOLSKY e MEANEY, 1986). A ligação ao hormônio promove uma mudança conformacional permitindo ao complexo atravessar a membrana nuclear onde se liga ao DNA ou as suas proteínas associadas e influencia a expressão gênica. As maiores concentrações desses receptores encontram-se no hipocampo (células piramidais do *cornu amoni* e células granulares do giro denteado), mas grandes concentrações também são encontradas na amígdala cortical, no núcleo lateral do septo, no córtex frontal, no cerebelo, no hipotálamo, no caudado/putâmen e na pituitária (SAPOLSKY e MEANEY, 1986). A existência de receptores com diferentes afinidades caracteriza a

relação entre os níveis circulantes do hormônio e a resposta por eles produzida como uma curva em forma de U, significando que até certo ponto os efeitos são benéficos, a ultrapassagem desse ponto, no entanto, se traduz em efeitos deletérios (KING, 2016). Assim, a ativação do eixo HPA por um agente estressor produz aumento da gliconeogênese, da glicogenólise, da lipólise e da proteólise e supressão das ações anabólicas do hormônio do crescimento, da insulina e dos esteroides sexuais em seus órgãos-alvo, ou seja, respostas benéficas para a adaptação à situação estressora. A persistência do agente estressor, no entanto, torna essas respostas deletérias. Há aumento da adiposidade visceral, supressão da atividade osteoblástica, diminuição da massa magra e desenvolvimento da resistência à insulina (CHROUSOS, 2000).

Os glicocorticoides circulantes potencializam vários efeitos mediados pelo componente simpático do SNA, como a vasoconstrição periférica. Portanto, o SNA e o eixo HPA possuem ações complementares durante o estresse (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). Por outro lado, no término da resposta a um agente estressor, os glicocorticoides exercem importante função agindo como efector de um *feedback* negativo de sua própria secreção ao nível do PVN, bem como agindo sobre o hipocampo e o córtex pré-frontal (HERMAN, 2012). No PVN, as altas concentrações de corticosterona agem inibindo a secreção do ACTH e suprimindo a expressão de POMC na pituitária anterior (WEISER, 2011). Quanto ao hipocampo e ao córtex pré-frontal, ambas as estruturas parecem agir em paralelo. A estimulação elétrica do hipocampo foi suficiente para reduzir os níveis circulantes de glicocorticoides (HERMAN, 2012). Enquanto que a estimulação química do córtex pré-frontal foi suficiente para modular as resposta neuroendócrinas do eixo HPA (JONES, 2011). Ambas as estruturas expressam receptores de glicocorticoides sugerindo a ação do hormônio nessas regiões para inibição do estresse (HERMAN, 2012) Figura 1.

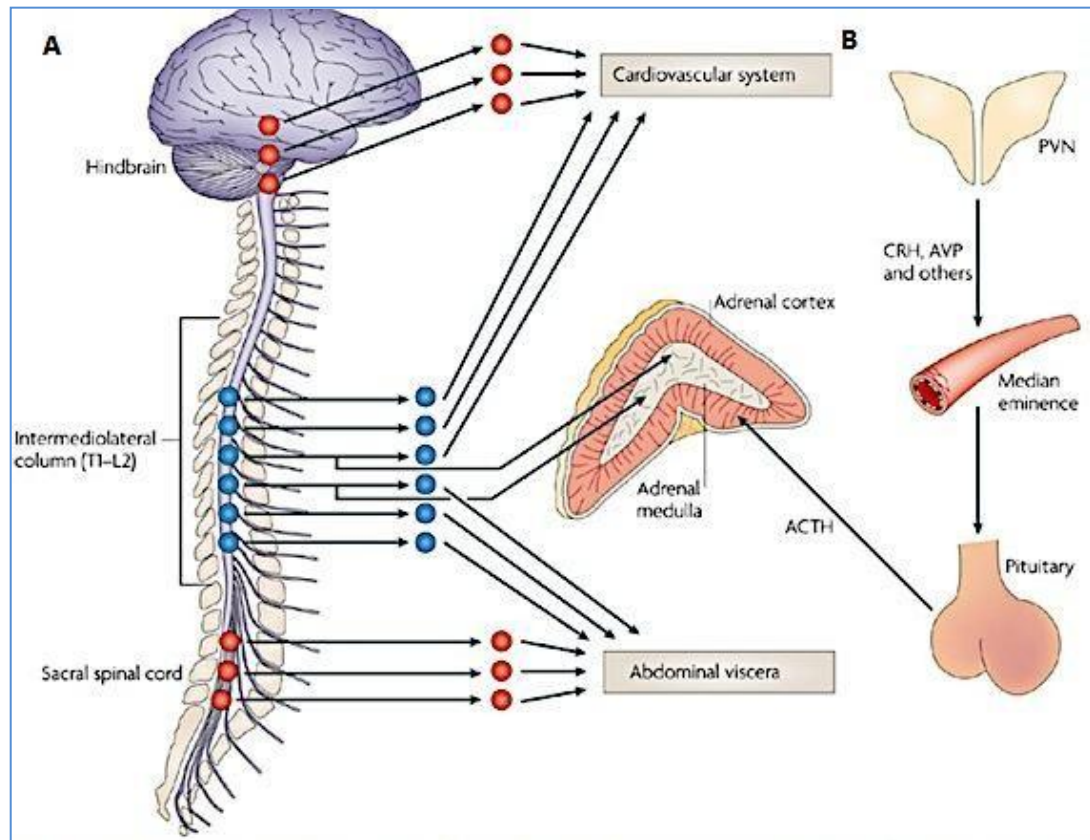


Figura 1. Representação esquemática dos componentes simpático (azul) e parassimpático (vermelho) do sistema nervoso autônomo (A) e do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (B). Retirado do artigo: *Nature Reviews Neuroscience* (2009), 10, 397-409.

Estresse neonatal

Em ratos, tanto o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) quanto a hipófise e a glândula adrenal são formados durante o período gestacional. O PVN é formado durante a última semana de gestação. A síntese de seus hormônios, CRH e AVP, já ocorre nos dias 17 (GRINO M, 1989; BARAM T, 1991; UGRUMOV, 1991) e 18 de vida gestacional, respectivamente (WHITNALL, 1985; ALMAZAN, 1989; LAURENT, 1989). Quanto à glândula pituitária, sua formação é iniciada precocemente durante a vida embrionária, por volta do dia 9 já pode ser identificada a bolsa de Rathke a qual, posteriormente, dará origem à glândula (ZHU *et al.*, 2007). A sua produção de POMC pode ser detectada no dia 13 gestacional (PINTAR, 1987), antes da produção do CRH indicando que, durante esse período, a produção de POMC independe da ação do CRH (KELLER-WOOD, 2015). Não obstante, a glândula adrenal é dependente do ACTH, originário da POMC, para a maturação da sua região cortical (COLL *et al.*, 2004). As células que compõem a adrenal já estão

presentes no embrião por volta do dia 9 (XING *et al.*, 2015) e a produção de corticosterona é detectada no dia 16 de gestação (DUPOUY, 1975).

A despeito da emergência precoce das estruturas que compõem o eixo HPA, a resposta ao agente estressor está atenuada nesse período, por isso, ele é denominado Período Hiporresponsivo ao Estresse (PHRS ou, do inglês, SHRP) (LUPIEN *et al.*, 2009). Em roedores, esse período corresponde às primeiras duas semanas de vida (LEVINE, 1994). No SHRP os níveis basais de glicocorticoides estão abaixo do normal e mesmo a exposição a um agente estressor, como éter, manipulação, calor, choque elétrico, cirurgia ou frio (TANG e PHILLIPS, 1977; SAPOLSKY e MEANEY, 1986), aumentam discretamente os níveis do hormônio (TANG e PHILLIPS, 1977; LUPIEN *et al.*, 2009). O impacto negativo dos glicocorticoides no Sistema Nervoso em desenvolvimento justifica a necessidade da manutenção de baixos níveis do hormônio durante esse período (LUPIEN *et al.*, 2009). Altas doses de glicocorticoides, administradas no período neonatal, são capazes de diminuir a mitose, a mielinização, o conteúdo de DNA e o tamanho do cérebro (LEVINE, 1994). Provavelmente a presença de receptores para o hormônio em todo o encéfalo contribui para os efeitos prejudiciais observados. Como citado anteriormente, esses receptores podem agir como fatores de transcrição e influenciar a expressão gênica afetando permanentemente o funcionamento cerebral. Assim, há rápida regressão do eixo HPA após o nascimento (LUPIEN *et al.*, 2009).

Durante a gestação, em ratos, a corticosterona está presente em níveis iguais ou ligeiramente maiores do que os do adulto (15-25 µg/100ml). Ao nascimento, 6-8 horas, esses níveis caem consideravelmente e permanecem diminuindo até concentrações de 1-3 µg/100ml nos primeiros 2 dias de vida (TAKEUCHI *et al.*, 1977). Embora a zona fetal do córtex da adrenal, produtora de corticosterona, esteja reduzida durante o SHRP, comparada ao período pré-natal, a glândula é capaz de produzir a corticosterona com uma capacidade semelhante a do adulto (SAPOLSKY e MEANEY, 1986). Assim, os baixos níveis de corticosterona ocorrem devido a outros fatores que não dizem respeito à capacidade glicocorticoidogênica da adrenal. A pituitária, estrutura que se encontra um nível acima da adrenal no eixo HPA, também secreta o seu hormônio, o ACTH, no entanto, possui menos células secretoras e menor sensibilidade ao seu secretagogo, o CRH (SIPERSTEIN *et al.*, 1954; WALKER *et al.*, 1986). Este, também produzido em menor quantidade pelo

PVN, e os níveis diminuídos de ACTH, parecem ser os principais contribuintes para o SHRP (SAPOLSKY e MEANEY, 1986).

A liberação do CRH produzido pelo PVN pode ser demonstrada no terceiro dia de vida pós-natal (DPN) (WALKER *et al.*, 1986; SHANKS, 1994). No entanto, a exposição à injeção intraperitoneal no DPN 16 ou mais tarde a um agente estressor, aumenta o CRH, mas não é eficiente em produzir um aumento significativo dos níveis do hormônio ACTH até, pelo menos, a segunda semana de vida (DENTAB, 1999), sugerindo um desacoplamento entre o ACTH e seu hormônio liberador. Uma particularidade da corticosterona nesse período traduz-se no fato de que, embora a quantidade do hormônio seja menor durante o SHRP, ele se encontra livre. No animal maduro a corticosterona percorre o sangue ligada à transcortina ou CBG (Globulina Ligadora de Corticosteroide), a qual se encontra em baixos níveis no SHRP (SMITH e HAMMOND, 1991). Assim, há mais corticosterona livre para se ligar ao seu receptor durante as duas primeiras semanas de vida. Além disso, nos animais maduros existe o receptor semelhante à CBG presente na membrana celular, o qual possui afinidade pela corticosterona semelhante àquela do receptor citoplasmático de glicocorticoides e compete com este pela ligação do hormônio (MCEWEN, 1976). No SHRP a expressão desse receptor também diminui e, uma vez que a ligação a ele forma um complexo não-funcional, não existindo esse competidor na membrana a corticosterona pode alcançar o citoplasma e, assim, o sinal do glicocorticoide existente é amplificado, mesmo em quantidade reduzida. O resultado dessa amplificação é o bloqueio da responsividade ao CRH ao nível da pituitária (KELLER-WOOD e DALLMAN, 1984). Somado à baixa produção de CRH pelo hipotálamo, a secreção de ACTH em resposta ao estresse parece improvável no SHRP (SAPOLSKY e MEANEY, 1986).

O cuidado materno é essencial para a manutenção do SHRP em roedores (LUPIEN *et al.*, 2009). Filhotes de mães mais cuidadosas (maiores níveis de *licking* e *grooming*, que expressa o comportamento de lambear os filhotes) apresentam, na vida adulta, respostas do eixo HPA atenuadas ao estresse psicológico e reduzida vulnerabilidade à ansiedade (LIU *et al.*, 1997). A diminuição do contato entre mães e filhotes durante longos períodos de separação parece ser crucial para o aumento da responsividade ao estresse. Tem sido proposto que diferenças no cuidado materno refletem a demanda ambiental a que os filhotes estarão expostos. Durante a amamentação os animais ainda estão no ninho e têm pouca experiência com o

ambiente. As mães, ao contrário, lidam com a escassez alimentar, a instabilidade social e problemas com territorialidade (CHAMPAGNE e MEANEY, 2001). Essas condições adversas afetariam o cuidado materno o qual serviria como um transdutor das condições ambientais aos filhotes, tornando-os, por exemplo, mais ansiosos e neofóbicos (CHAMPAGNE e MEANEY, 2001). Embora sejam comportamentos patológicos seriam adaptativos num ambiente adverso.

Esse cuidado é tão importante que mesmo durante o SHRP, a separação das mães é capaz de induzir a resposta ao estresse (HUOT *et al.*, 2002). A separação por 3 horas diárias, ou mais, durante o SHRP é capaz de ativar o eixo HPA elevando os níveis de glicocorticoides (HUOT *et al.*, 2002) e ACTH, induzindo mudanças permanentes na expressão do receptor de CRH na pituitária (LUPIEN *et al.*, 2009). Também, promove aumento na expressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo (XU *et al.*, 2011). Essas alterações se refletem no funcionamento do eixo HPA ao longo da vida. Tem sido demonstrado que animais separados de suas mães durante o SHRP apresentam uma resposta exagerada ao experimentar um estresse mais tarde na vida, ou seja, são hipersensíveis ao estresse (KALINICHEV *et al.*, 2002; LUNDBERG *et al.*, 2017). Esses animais apresentam maior liberação de corticosterona em resposta ao estresse de contenção (LEHMANN *et al.*, 2002) e maior expressão de receptores de CRH na amígdala após choque elétrico nas patas (BARNA *et al.*, 2003).

Além de influenciar o desenvolvimento do eixo HPA, a presença materna durante o SHRP, também parece influenciar os padrões alimentares dos filhotes. A separação materna por 24 horas no PND 5 está associada à baixa ingestão alimentar de dieta padrão e à menor ingestão de alimentos ricos em carboidratos (PENKE *et al.*, 2001). O isolamento social em animais previamente separados esteve associado à maior ingestão alimentar e ganho de peso (RYU *et al.*, 2009). Se a alteração dos padrões alimentares se dá diretamente pela separação materna, como parece acontecer com o eixo HPA, ou se é secundária às alterações do eixo HPA, não está bem esclarecido.

Comportamento alimentar

O comportamento alimentar se expressa tanto no ato de ingerir alimentos quanto na inibição da ingestão característica dos períodos entre refeições. Diversos são os fatores que influenciam ambos os processos, a saber, fisiológicos, psicológicos, sociais e genéticos (GRIMM e STEINLE, 2011). O estudo do

comportamento alimentar tenta definir os padrões alimentares, como tempo e duração da refeição e quantidade ingerida, as preferências alimentares, a motivação para iniciar a ingestão, os fatores que levam à saciação e aqueles que mantêm a saciedade, dentre outros (BELLISLE *et al.*, 2012). A diversidade de fatores influenciando a expressão desse comportamento demonstra a interação de estímulos internos e externos na determinação do consumo ou da inibição deste. Internamente, o comportamento alimentar é regulado pela ação de estruturas nervosas, como o hipotálamo e o tronco encefálico, de neurotransmissores, como a serotonina e a dopamina, do sistema endócrino, do pâncreas, do tecido adiposo e do trato gastrointestinal (GAHAGAN, 2012). Externamente, fatores relacionados ao alimento, como o odor, a textura e a temperatura, ou ao contexto social, como o fato de estar sozinho ou acompanhado ou, ainda, às experiências vividas no início da vida, influenciam esse comportamento (GAHAGAN, 2012).

Reguladores endógenos do comportamento alimentar

O hipotálamo tem sido reconhecido como uma estrutura central na modulação do comportamento alimentar, com ênfase na ação de alguns de seus núcleos como o arqueado (ARC) e o paraventricular (PVN) (SOHN, 2015). No núcleo arqueado podem ser identificadas populações neuronais produtoras do Neuropeptídeo Y (NPY), da Proteína Relacionada ao gene Agouti (AgRP), da Pró-opiomelanocortina (POMC) e do Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina (CART) (ELIAS, 1998; HAHN, 1998). Tanto o NPY quanto o AgRP são co-expressos pela mesma população neuronal enquanto que uma população distinta co-expressa POMC e CART (COWLEY, 1999). Ambos, NPY e AgRP possuem ação orexígena (CLARK, 1984; SMALL *et al.*, 2003) enquanto POMC/CART possuem ação oposta (YASWEN, 1999; OKUMURA, 2000). Receptores para esses neuropeptídeos são expressos no PVN (BROBERGER, 1999; SILJEE *et al.*, 2013) embora ainda não se conheça exatamente o receptor responsivo ao CART (LAU e HERZOG, 2014). O aumento do NPY e do AgRP no PVN promovem ingestão alimentar (KALRA, 1991; SHRESTHA *et al.*, 2006). Em contrapartida, o aumento do hormônio α -melanócito, derivado da POMC, bem como do CART no PVN, inibem o consumo (STANLEY, 2001; WIRTH, 2001).

Esses neuropeptídeos hipotalâmicos recebem estímulo para a sua síntese e liberação oriundos, por exemplo, de neurotransmissores produzidos em outras regiões do SNC, como a serotonina. Esta é produzida no tronco encefálico e, seus

neurônios emitem projeções para diversas regiões no SNC incluindo o ARC. A ação da serotonina no ARC hiperpolariza os neurônios NPY/AgRP inibindo-os enquanto ativa os neurônios POMC/CART e, conseqüentemente, promove inibição da ingestão alimentar (HEISLER *et al.*, 2006). A dopamina, outro neurotransmissor também sintetizado no tronco encefálico, age sobre o PVN, via receptores D1 e D4, estimulando a ingestão alimentar (TEJAS-JUAREZ *et al.*, 2014; MIRMOHAMMADSADEGHI *et al.*, 2018).

Sinais humorais, como a insulina e a leptina, também modulam a síntese e liberação dos neuropeptídeos hipotalâmicos (SCHWARTZ *et al.*, 2000). A insulina, sintetizada pelas células β pancreáticas (GONZALEZ *et al.*, 2009), junto à leptina, produzida pelo tecido adiposo (LEONHARDT, 1999) têm sido denominadas sinais de adiposidade (SCHWARTZ *et al.*, 2000). São assim denominadas, pois são secretadas proporcionalmente ao conteúdo de gordura corporal (BAGDADE, 1967; CONSIDINE, 1996), funcionando como tradutores dos níveis de energia armazenada em forma de gordura. O hipotálamo recebe esses e outros sinais periféricos e os integra aos centrais resultando ou em inibição das vias anabólicas e da ingestão alimentar, pelo aumento de POMC/CART, ou em estímulo das vias catabólicas e aumento da ingestão alimentar, pelo aumento do NPY/AgRP (SCHWARTZ *et al.*, 2000).

Esses sinais adiposos agem em longo prazo, num período que compreende várias refeições e para a regulação em curto prazo, ou seja, aquela que compreende o período de apenas uma refeição destaca-se a ação do TGI e do tronco encefálico (SCHWARTZ *et al.*, 2000). O TGI transmite muitas das informações relativas ao seu conteúdo via aferências vagais. Essas informações são de natureza mecânica, como a distensão gástrica, e química, como a composição nutricional do alimento, oriundas de diferentes porções do trato, como estômago e intestinos. As aferências vagais provenientes do estômago são estimuladas mediante o aumento de volume em seu interior, independente da composição deste (HUO *et al.*, 2007). As aferências intestinais demonstram diferentes padrões de ativação a depender da composição do quimo. Outras informações, referentes ao metabolismo energético no fígado, ao sabor dos alimentos na cavidade oral e sinais humorais, como a colecistoquinina, também percorrem o nervo vago através de impulsos nervosos até os centros neurais durante a ingestão alimentar. O nervo vago conduz essas informações ao Núcleo do Trato Solitário (NTS) no tronco encefálico. Como

consequência, há ativação do NTS e inibição do consumo alimentar (HUO *et al.*, 2007). Além disso, o TGI secreta hormônios com ação regulatória sobre a ingestão. As variações nas concentrações desses sinais humorais contribuem para a manutenção da saciedade no período entre refeições bem como determina o início de novo episódio alimentar. Hormônios como a colecistoquinina, a ghrelina e o peptídeo YY exemplificam essa ação regulatória. A colecistoquinina é sintetizada e liberada por células do duodeno e age tanto no TGI, via receptores CCKA, como no cérebro, via CCKB, reduzindo a ingestão alimentar. A ghrelina é o único hormônio orexígeno conhecido sintetizado pelo TGI, majoritariamente pelas células gástricas. Age nos receptores GH-RH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) no hipotálamo e tronco encefálico. Sua concentração aumenta no sangue durante o jejum de maneira a estimular o início da alimentação. O peptídeo YY, sintetizado pelas células L intestinais, age nos receptores da família Y(Y1,Y2,Y4 e Y5), com maior afinidade pelo receptor Y2 (BATTERHAM e BLOOM, 2003). Seus níveis plasmáticos estão elevados por volta de 1 hora após a refeição e promovem a inibição da ingestão (MOURA, 2013).

Reguladores exógenos do comportamento alimentar

Além dos estímulos internos, fatores externos podem influenciar o comportamento alimentar. Um desses fatores é o odor do alimento. Foi observada correlação positiva entre as sensações de querer e gostar associadas ao odor de coco e a quantidade de doce de coco ingerida posteriormente (SAILER *et al.*, 2016) indicando maior propensão à ingestão daqueles alimentos previamente aprovados pelo olfato. Com relação à textura, foi demonstrado que tanto a taxa de consumo quanto a quantidade ingerida diminuíram quando os alimentos apresentavam rigidez suficiente para induzir mordidas menores associadas a maior frequência mastigatória e maior exposição oro-sensorial (FORDE, 2013). A temperatura do alimento, por sua vez, pode influenciar a percepção do sabor. Parece haver um limiar de temperatura para a percepção dos quatro sabores básicos e esse limiar se encontraria entre 20 e 30°C. Ademais, as variações na detecção dos sabores se expressariam numa curva em forma de U. Assim, temperaturas acima de 30°C dificultariam a percepção dos sabores mais tênues num alimento (GREEN e NACHTIGAL, 2015).

A despeito dos fatores inerentes ao alimento, o contexto social exerce influência significativa sobre o comportamento alimentar. Foi demonstrado que estar

acompanhado ou sozinho influencia a ingestão alimentar em crianças, de maneira que crianças eutróficas comiam maiores porções quando estavam na presença de outras crianças do que quando se encontravam sozinhas (SALVY *et al.*, 2007). Em adultos, foi demonstrado que hábitos dietéticos saudáveis, representados pela ingestão frequente de frutas e verduras, foram influenciados pelo estado civil, relação com familiares (relação de proximidade ou isolamento) e pela frequência de interações sociais. O escasso contato com a família e a viuvez associados ao isolamento social contribuíram para o estabelecimento de hábitos alimentares menos saudáveis (CONKLIN *et al.*, 2014). A fase do desenvolvimento, infância (5-7 anos) ou adolescência (13-15 anos), influenciou as escolhas alimentares de maneira que crianças ingeriram lanches mais saudáveis na presença das mães quando comparado à ingestão em companhia de amigos enquanto que adolescentes, do sexo feminino, apresentaram um padrão contrário, com maior ingestão de lanches saudáveis na presença de amigas (SALVY *et al.*, 2011).

Em algumas situações, as experiências sociais prévias, modulam significativamente o comportamento alimentar. É o que tem sido observado nos estudos que avaliam a influência da exposição a situações estressoras durante os primeiros anos de vida e as consequências dessa exposição precoce sobre os padrões do comportamento alimentar na vida adulta (KOCH *et al.*, 2008; MOENS *et al.*, 2009; PARKS *et al.*, 2012). O estresse é capaz de influenciar o funcionamento dos circuitos hipotalâmicos e de vias cerebrais relacionadas à recompensa alimentar. Essa influência se revela a nível comportamental diminuindo a ingestão alimentar em resposta ao estresse agudo e aumentando essa ingestão em resposta ao estresse crônico, em muitos casos (ANDREWS e ABIZAID, 2014). No entanto, essa resposta comportamental pode ser modulada por, pelo menos, 2 fatores: I) a composição do alimento ou II) a experiência prévia com o estresse. Com relação à composição do alimento, aumento do consumo após estresse foi observado quando o alimento era densamente energético ou palatável (PECORARO, N. *et al.*, 2004). Além disso, em indivíduos estressados, houve preferência por alimentos hiperlipídicos (LA FLEUR *et al.*, 2005). Quanto aos estudos em indivíduos que experimentaram o estresse precocemente é possível ressaltar o impacto das experiências com o ambiente, sobretudo no período de desenvolvimento, para a determinação do estado saúde-doença. O drástico aumento nos casos de doenças crônicas, como a obesidade, o câncer e o diabetes, desvinculado de variações

genéticas significativas sugere que os fatores ambientais exercem papel fundamental na etiologia dessas doenças (HAUGEN *et al.*, 2015). Nesse contexto, a experiência precoce com o estresse configura como importante fator no desenvolvimento de transtornos alimentares em longo prazo.

Estresse neonatal e Comportamento alimentar

Quando o estresse ocorre no início da vida pode levar a disfunções na regulação da ingestão alimentar e à obesidade na vida adulta. Crianças de famílias nas quais se vivenciam altos níveis de estresse são mais propensas a serem obesas do que aquelas de famílias sem tais níveis (KOCH *et al.*, 2008; MOENS *et al.*, 2009; PARKS *et al.*, 2012). O abuso sexual na infância é um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade e bulimia nervosa na vida adulta (IRVING, 1993; KOCH *et al.*, 2008; D'ARGENIO *et al.*, 2009). A perda da mãe ou de algum parente próximo no início da vida aumenta o risco de obesidade na vida adulta (KOCH *et al.*, 2008; D'ARGENIO *et al.*, 2009) e a exposição a situações de guerra durante a infância esteve associada a maior Índice de Massa Corporal (LLABRE e HADI, 2009).

Em modelos experimentais com animais, o estudo do estresse no início da vida tem sido realizado utilizando-se a separação materna como um modelo de estresse precoce (DA SILVA *et al.*, 2014). Diferentes protocolos de separação materna têm sido empregados nesses estudos e um resumo das condutas adotadas nesses protocolos está descrito na tabela 1. A fase do ciclo em que a separação ocorre é um importante fator na determinação dos resultados e os protocolos diferem, com alguns estudos realizando a separação na fase clara (HOLUBOVA *et al.*, 2017) e outros na fase escura (TSUDA, 2012). Um exemplo da importância da fase foi avaliado em estudo que realizou a separação no claro e no escuro e demonstrou que a ingestão noturna das fêmeas separadas diminuiu comparada a ingestão das controles apenas se a separação ocorreu na fase escura do ciclo (DA SILVA *et al.*, 2014). Diferenças como essas demonstram a necessidade da padronização do protocolo de estresse neonatal por separação materna. Na figura 3 encontra-se resumido o protocolo mais frequente de separação materna e outras manipulações menos frequentes. Observa-se que é mais frequente separar os animais na fase clara do ciclo. Para roedores, nesta fase há maior atividade, permanecendo a mãe mais tempo no ninho. Assim, a separação materna no claro pode também interferir com a amamentação. Mais estudos precisam ser realizados

nas duas fases para definir qual é mais representativa do que ocorre em humanos. Um outro ponto importante a ser considerado com relação aos protocolos de separação materna é a composição das ninhadas quanto ao sexo. Aumento na preferência à sacarose foi observado apenas quando as ninhadas eram compostas dos dois sexos (MICHAELS, 2006). A quantidade entre filhotes de ambos os sexos também pode influenciar as repercussões da separação materna. Assim, o resultado de um estudo que utiliza a mesma quantidade de machos e fêmeas pode ser diferente de um que utiliza um mínimo de 2 animais do sexo não predominante. Vale salientar que obter ninhadas com a mesma quantidade de machos e fêmeas nem sempre é possível e outro fator está associado em alguns casos, a adoção de filhotes, o que também pode alterar os resultados e dificultar as comparações. A remoção da ninhada do ninho é outra manipulação frequente. O olfato dos neonatos influencia os comportamentos de amontoamento, orientação e amamentação dos filhotes e esses comportamentos, por sua vez, reorganizam circuitos olfativos responsivos aos odores provenientes do ninho. Esse aprendizado olfativo inicial influencia aspectos de reconhecimento social, incluindo idade, sexo, status e condição reprodutiva de um membro da mesma espécie e é o alicerce sobre o qual todas as relações sociais são construídas (MELO, 2006). As características dos animais incluídos no grupo controle também podem variar com os diferentes estudos. Na maioria dos estudos, os animais não são perturbados, exceto para a limpeza das gaiolas, em outros os animais considerados controles são aqueles separados por 15 min, havendo aqueles que separam por 3, 5 ou 10 min. A separação por curto período de tempo tem sido denominada “handling” (MCINTOSH *et al.*, 1999). A justificativa para utilizá-la como controle é por mimetizar o que ocorre com os roedores selvagens, para os quais as mães deixam o ninho por curtos períodos de tempo (MANIAM, 2010). O padrão comportamental desses animais é muito diferente dos separados por longos períodos (MANIAM e MORRIS, 2010). No entanto, permanece a dúvida quanto ao melhor modelo para o grupo controle. Além disso, resultados variam a depender da espécie, tempo de separação e quantidade de dias em que são separados, entre outros fatores que precisam ser mais bem avaliados para a padronização do protocolo de separação materna.

Apesar de todas essas discrepâncias na aplicação desse modelo de estresse precoce alguns desfechos sobre o padrão do comportamento alimentar podem ser observados. Em animais separados tem sido observado aumento do consumo de

dieta palatável (MANIAM e MORRIS, 2010), maior preferência para solução contendo sacarose (MICHAELS e HOLTZMAN, 2007), aumento do consumo de dieta padrão após a separação materna em animais expostos a ciclos de jejum e alimentação (RYU *et al.*, 2009) e antecipação do ponto de saciedade (DA SILVA *et al.*, 2014). Um resumo dos principais achados da associação entre estresse precoce e comportamento alimentar encontra-se descrito na tabela 2.

Esses achados indicam que o ambiente no início da vida desempenha um papel crítico no estabelecimento dos circuitos que regulam o estresse e o comportamento alimentar e influencia a interação entre ambos. Assim, o estudo do impacto do estresse precoce sobre o estado saúde-doença e, mais especificamente, sobre as disfunções alimentares na vida adulta ajudará a esclarecer as diferenças individuais na relação com o alimento em resposta ao estresse e a intervir precocemente visando a prevenção de distúrbios, bem como possibilitará o melhor tratamento das disfunções alimentares já estabelecidas.

Tabela 1. Variáveis observadas nos protocolos de separação materna e suas diferenças de aplicação.

Variável	Protocolo mais comum	Protocolo menos comum
Linhagem	Sprague Dawley	Wistar, Long Evans, C57BL/6 ou Listerhooded
Tempo de separação	180 minutos	24h, 360 minutos ou 60 minutos
Separação na fase clara	Sim	Não
Dia de ajuste da ninhada	1 dia após o nascimento	2 dias após o nascimento
Tamanho da ninhada	10 animais	8, 12 ou 13 animais
Dias de separação	1-14 DPN*	DPN: 2-14, 3-14, 1-10, apenas no dia 14, 6-21, apenas no dia 5, 5-12, 1-21, 2-21, apenas no dia 3, apenas no dia 4 ou apenas no dia 9.
Grupo controle	Sem perturbação exceto para limpeza de gaiolas	Sem perturbação ou 3, 5, 10 ou 15 minutos de separação.
Remoção do ninho	Sim	Não
Remoção do biotério	Sim	-
Remoção da vista da mãe	Sim	-
Dia de desmame	Dia 21 ou 22	20, 23, 24, 25 ou 26
Isolamento pós-desmame	Não	Sim
Temperatura durante a separação	32°C	Sem controle, 30-32°C, 33-34°C, 31°C, 35°C, 28°C, 30°C ou 33°C
Remoção da ninhada inteira	Sim	Não

Jfreak0102

*Dia pós-natal (DPN)

Tabela 2. Análises dos componentes hedônico e homeostático do comportamento alimentar.

	Machos			Fêmeas			Mães		
	↑	↓	↔	↑	↓	↔	↑	↓	↔
Preferência/ingestão de sacarose ou sacarina	3	1	3	-	-	3	2	1	-
Ingestão de dieta palatável	1	-	2	-	-	1	-	-	-
Preferência a macronutrientes	-	1	-	-	1	-	-	-	-
COMPONENTE HOMEOSTÁTICO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR									
	Machos			Fêmeas			Mães		
	↑	↓	↔	↑	↓	↔	↑	↓	↔
Ingestão de dieta padrão	5	-	5	1	1	6	-	-	-
Ingestão de dieta padrão após ciclos de alimentação e jejum	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ingestão de dieta padrão com jejum de 23h ou de 22h mais exercício	-	-	1	-	-	1	-	-	-
Ingestão de dieta padrão após aplicação de droga anorexígena	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ingestão de dieta padrão na Sequência Comportamental de Satedade	-	-	1	1	-	-	-	-	-
Ingestão de dieta padrão na hiperfagia de rebote	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Ingestão de dieta padrão restrita a algumas horas do dia	-	-	1	-	-	1	-	-	-

Análises realizadas em animais que experimentaram a separação materna durante a lactação. “↑”, “↓” e “↔” significam que houve aumento, diminuição ou não houve alteração, respectivamente, no grupo separado comparado ao controle para o parâmetro analisado. Os números referem-se à quantidade de análises diferentes para cada teste.

3 HIPÓTESE

A separação materna neonatal prejudica componentes do controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar envolvendo os sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e dopaminérgico.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar, em ratos, jovens e adultos, machos e fêmeas, os efeitos da separação materna na lactação sobre parâmetros do comportamento alimentar homeostático e hedônico.

4.2 Específicos

Em ratos, submetidos ou não à separação materna, machos e/ou fêmeas, avaliar:

- A evolução ponderal;
- O consumo alimentar após estresse alimentar agudo ou crônico;
- A Preferência alimentar segundo a fase de luminosidade;
- A ansiedade experimental;
- O consumo alimentar de 24 horas;
- O consumo alimentar associado ou não à administração de fluoxetina;
- A Sequência Comportamental de Saciedade;
- O consumo de dieta palatável;
- A expressão gênica de receptores serotoninérgicos 5HT1B e 5HT2C, do transportador serotoninérgico e de receptores dopaminérgicos DRD1 e DRD2;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As fêmeas nulíparas com peso entre 250 e 300 g foram mantidas em Biotério de experimentação no Departamento de Anatomia da UFPE com temperatura de 22° C ($\pm 1^\circ\text{C}$), Ciclo claro/escuro de 12-12h invertido (com luzes acesas às 18h) e livre acesso à água e à dieta padrão do biotério (Presence®). O manejo e os cuidados seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo 23076.043927/2014-06). Após adaptação foram realizados acasalamentos na proporção de duas fêmeas (nulíparas) para um macho. Após cinco dias, as fêmeas foram acomodadas em gaiolas individuais e o peso corporal aferido a cada três dias para confirmação da prenhez. As ratas tiveram livre acesso a água e dieta. O dia de nascimento dos filhotes foi considerado o dia 0, sendo a manipulação para redução da ninhada realizada no 2° dia de vida. Após a separação, cada ninhada foi constituída de oito ratos (machos e fêmeas tendo o cuidado de não haver menos de 2 ratos do sexo oposto ao dominante). Ao 21° dia os animais foram desmamados e mantidos em caixas com três a quatro animais, com fêmeas separadas dos machos e livre acesso à dieta padrão e água.

5.2 Separação materna e formação dos grupos experimentais

Os grupos experimentais foram delineados de acordo com a presença ou não da separação materna. Esta consistiu da separação entre mães e filhotes durante período 3 horas do segundo ao décimo quarto dia de vida durante a fase escura (Figura 2). Cada ninhada foi constituída por oito filhotes de ambos os sexos. Durante o período de separação, os filhotes foram mantidos em incubadoras com características da gaiola original, com temperatura controlada de 30-32°C e em sala diferente daquela onde permaneceu a mãe (PLOTSKY e MEANEY, 1993). O grupo controle foi constituído por ninhadas que não foram manipuladas, exceto para a limpeza das gaiolas. Foram, assim, formados os grupos separação materna e controle. Ratos machos e fêmeas foram utilizados para o estudo. Após o desmame, os animais foram agrupados em gaiolas separadas por sexo, com dois a quatro

animais cada até o início dos experimentos. Dois filhotes de cada ninhada foram distribuídos nas várias análises realizadas para evitar o efeito provocado pela relação social que existe na ninhada.

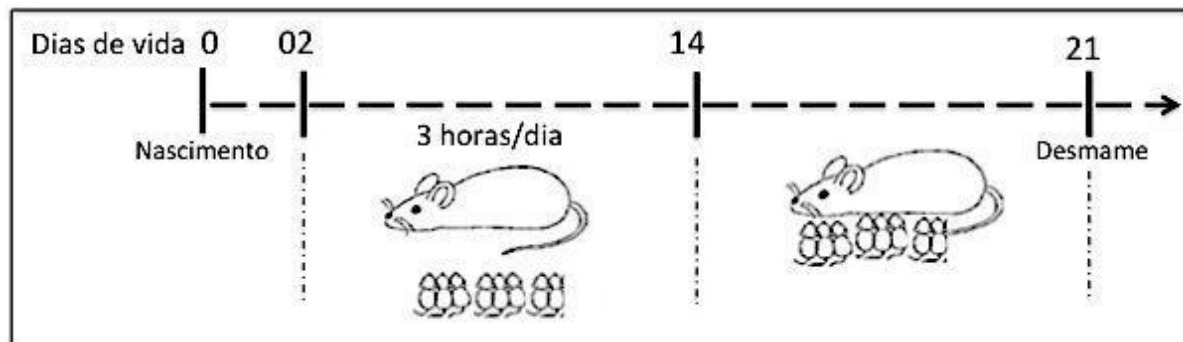


Figura 2. Esquema do desenho experimental da separação materna.

A seguir, será descrita a metodologia segmentada em três experimentos distintos. No experimento 1 foram utilizados apenas ratos machos, no 2 apenas fêmeas e no 3 machos e fêmeas.

5.3 Experimento 1

5.3.1 Peso corporal

O peso corporal (g) individual de todos os animais foi aferido aos 21, 30 e 50 dias de vida, e em dias de experimentos. Utilizou-se balança digital, com sensibilidade de 0,001g.

5.3.2 Consumo alimentar após estresse alimentar agudo ou crônico

Os animais, aos 60 dias de vida, foram submetidos ao estresse alimentar por 21 dias consecutivos. Este consistiu de exposição visual e olfativa do animal a alimento palatável (Cookies de chocolate (Bauduco®) por vinte minutos. O alimento foi envolto em tela galvanizada (15cmx15cm) que não permitia a alimentação do animal. Foram realizadas análises do consumo em resposta ao estresse agudo ou crônico. Após vinte minutos de estresse, os animais tiveram acesso ao Cookies durante uma hora no dia 3 (estresse agudo) ou no dia 21 (estresse crônico). A ingestão alimentar (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada. Durante o período deste experimento, os animais tiveram livre acesso a dieta padrão. Entre os dias 3 e 21 do experimento, a ingestão de dieta padrão de 24 horas foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida no

horário após o estresse alimentar e a quota rejeitada no início do estresse alimentar do dia seguinte.

5.3.3 Preferência alimentar segundo a fase de luminosidade

O teste de preferência alimentar foi realizado aos 60 dias de vida. No início da fase clara e da escura, 1 hora após a mudança de fase, foi ofertado 30 gramas de dieta palatável (tabela 3) e mesma quantidade dieta padrão (Presence®). O consumo alimentar (g) foi quantificado através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada a cada 12 horas, ou seja, no final da fase clara e no final da fase escura do ciclo durante um período de 5 dias consecutivos.

Tabela 3. Constituintes da dieta experimental utilizada no estudo da preferência alimentar.

<u>Constituintes</u>	<u>Qtde (g)</u>
Farinha de trigo	13,0
Biscoito maizena	7,0
Farinha de soja	7,0
Caseína	15,0
Celulose	1,2
Goma	0,5
Banha	5,6
Margarina	4,5
Açúcar	27,0
Sais	1,5
Vitaminas	0,5
Colina	0,2
Metionina	0,2
BHT	0,14mg
Óleo de soja	<u>6,2 ml</u>
<u>Total</u>	<u>100</u>

5.3.4 Ansiedade experimental

O teste para avaliação da ansiedade foi realizado nos animais com idades entre 90 e 100 dias, durante 5 minutos entre 12 e 14h. Foi utilizado o modelo do labirinto em cruz elevado. Este labirinto é constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) que se estendem a partir de uma plataforma central comum (10x10cm), elevados a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso. O revestimento do piso e das paredes do braços e região central do labirinto é de material antiderrapante e escuro. Durante o teste, o labirinto foi iluminado com luz vermelha de baixa voltagem (15 W). Este modelo experimental é

baseado no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados. A realização do teste consistiu em colocar os animais, individualmente, no espaço central do aparelho, com a cabeça voltada para o braço aberto, e registrar os dados durante 5 minutos. Apenas um avaliador observou as sessões e registrou em protocolo o tempo de permanência e o número de entradas em cada braço. O registro de cada entrada teve validade a partir do momento em que o animal encontrou-se com as 4 patas em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado através de um cronômetro digital. O tempo de permanência nos braços abertos e fechados foi utilizado como índice de ansiedade.

5.3.5 Consumo alimentar de 24 horas

O consumo alimentar diário (24 horas) foi analisado aos 120 dias de vida. Os animais de ambos grupos experimentais, foram separados em gaiolas individuais dez dias antes do teste. Foi ofertada dieta padrão Presence[®]. O consumo alimentar (g) foi calculado a cada 24 horas. Esta análise foi realizada por 3 dias consecutivos, e os resultados foram representados pela média de consumo de cada animal a cada 24 horas durante os 3 dias de teste. A quota ingerida (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada a cada 24 horas.

5.3.6 Consumo alimentar em reposta à fluoxetina

A ação da fluoxetina sobre o consumo alimentar foi estudada em ratos com 150 dias de vida. Após o período de privação alimentar de oito horas, os animais receberam quantidade conhecida (30 gramas) de dieta padrão de biotério (Presence[®]). Trinta minutos antes da oferta do alimento foi administrada fluoxetina (10 mg/Kg de peso corporal., via intraperitoneal) para ambos os grupos experimentais. O consumo alimentar foi quantificado após o período de uma hora. A quota ingerida (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada. Uma semana depois, o mesmo procedimento foi realizado sem administração da droga.

5.4 Experimento 2

5.4.1 Consumo alimentar de 24 horas

Ratas fêmeas, com 300 dias de vida, foram separadas em gaiolas individuais 3 dias antes da análise. O consumo de ração padrão (g) foi aferido a cada 24 horas por três dias consecutivos. Os resultados foram representados pela média de consumo de cada animal durante os 3 dias de teste. A quota ingerida (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada a cada 24 horas.

5.4.2 Sequência Comportamental de Saciedade (SCS)

A SCS foi analisada em fêmeas em duas idades, aos 35 e aos 365 dias de vida. A análise da SCS foi descrita por (HALFORD *et al.*, 1998). Os animais foram mantidos em privação alimentar prévia de quatro horas antes da oferta de alimento (8 às 12 horas, ciclo escuro). A SCS foi registrada em protocolo padronizado por avaliador treinado durante uma hora. Foram registradas as durações, em segundos, dos seguintes comportamentos: a) Alimentação: Registro iniciado quando o rato foi observado ingerindo a ração no comedouro. O mesmo foi finalizado no momento em que o rato abandonou o comedouro, b) Limpeza: O animal procedeu inicialmente o lambar de patas anteriores e movimentos dessas sobre a cabeça continuando-se com o lambar da região ventral, do dorso e das patas posteriores, c) Repouso: O rato foi observado em posição de descanso, apresentando o corpo repousado sobre o assoalho da gaiola. Outras medidas registradas: consumo alimentar (diferença do peso (g) de ração oferecida e rejeitada durante o período de uma hora do registro da SCS), a duração da refeição (min), a taxa de alimentação (Kcal/min), o tamanho da refeição (g ração consumida /Kg de peso corporal) e latência para iniciar a alimentação (segundos).

Foi realizada a análise da ação da fluoxetina sobre a SCS em ratas aos 365 dias de vida. O procedimentos de análise da SCS foram idênticos ao descrito acima, exceto pela injeção de droga. Trinta minutos antes do início do registro da SCS foi administrada fluoxetina (10 mg/Kg de peso corporal) na concentração de 2,5mg/ml ou de solução salina (NaCl 0,9%) via intraperitoneal em ambos os grupos, separado e controle.

5.4.3 Eutanásia e obtenção do hipotálamo

A eutanásia foi realizada na fase escura (12h) por decapitação em guilhotina apenas em fêmeas adultas. A cabeça foi dissecada e o crânio aberto para retirada do encéfalo. Este foi dissecado para obtenção do hipotálamo, acondicionado em tubo plástico apropriado e imediatamente congelado em gelo seco. As amostras permaneceram em freezer -80 °C até o momento das análises.

5.4.4 Análise da expressão gênica

Os hipotálamos foram processados para análise da expressão gênica dos receptores serotoninérgicos *5HT1B* e *5HT2C* e do transportador de serotonina, SERT (Serotonin transporter) pelo método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O experimento de PCR em tempo real foi realizado com as amostras de hipotálamo seguindo as etapas descritas resumidamente a seguir. O método consiste em três etapas: 1) Extração do RNA Total; 2) Conversão do RNA em cDNA e 3) Amplificação da reação em cadeia da polimerase. O RNA total foi extraído utilizando 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) com um homogeneizador (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen® e, subsequentemente, a quantidade e qualidade do RNA purificado foram avaliadas utilizando-se o espectrofotômetro, NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com solução de gDNA Wipeout (Qiagen®, Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42°C, e armazenadas em gelo. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa de 2,0 microgramas de RNA purificado em cDNA, utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen®, Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min. A enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20°C até a sua utilização.

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

oligonucleotídeos ou "primers" utilizados para a amplificação são mostrados na Tabela 4.

Table 4: Sequência de *primers* desenhados para o estudo do *5ht1b*, *5ht2c*, *Sert* e do gene constitutivo de referência *Gapdh*.

Primers	Forward	Reverse
<i>5ht1b</i>	5'-ATGGAGGAGCAGGGTATTCAGTG- 3'	5'-TGGGAGAGGTTGGCGAGAGG-3'
<i>5ht2c</i>	5'-GGGTTGCTGCCACTGCTTTG-3'	5'-GCTCTCGCTTACACACTACTAATCC- 3'
<i>Sert</i>	5'-GGA GGC GAT GAG GAA AGA TGA TG-3'	5'-GGA AGA CAA AGA TGA TGG AGA ACG-3'
<i>Gapdh</i>	5'-GCGAGATCCCGTCAAGATCA-3'	5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG-3'

Os valores limites de ciclo (CT) das amostras foram determinados pela normalização a partir das curvas de fluorescência versus o número de ciclos de PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações dos primers (ou oligonucleotídeos) foram geradas traçando os valores médios dos valores de CT em função do logaritmo da quantidade de moléculas *template*. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi analisado por um método CT comparativo. A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra, que foi então normalizado com a referência endógena.

Onde ΔCT é a diferença entre a CT do gene de interesse e o *Gapdh*, e $\Delta\Delta CT$ para a amostra é igual ao ΔCT médio da amostra do grupo experimental, menos a média do ΔCT da amostra do grupo de controle (usado como parâmetro para calibração).

5.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) ou média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Para comparações múltiplas, foi utilizada ANOVA One Way ou Two Way, seguida do pós-teste de *Tukey* ou *Bonferroni*, adotando níveis de significância como $p < 0,05$.

5.6 Experimento 3

Os materiais e métodos do experimento 3 encontram-se descritos no apêndice 1 no final desta tese em forma de artigo publicado na revista *Appetite* (ISSN: 0195-6663), volume 123, sob o título “Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males”.

6 RESULTADOS

Experimento 1. Separação materna neonatal e comportamento alimentar

Peso corporal

O grupo separado apresentou menor peso corporal no 15º (C: $329,41 \pm 23,41$ vs S: $298,26 \pm 27,19$, $p < 0,05$) e no 21º (C: $351,22 \pm 24,99$ vs S: $316,50 \pm 36,77$, $p < 0,05$) dias de estresse crônico em relação ao grupo controle (Figura 3).

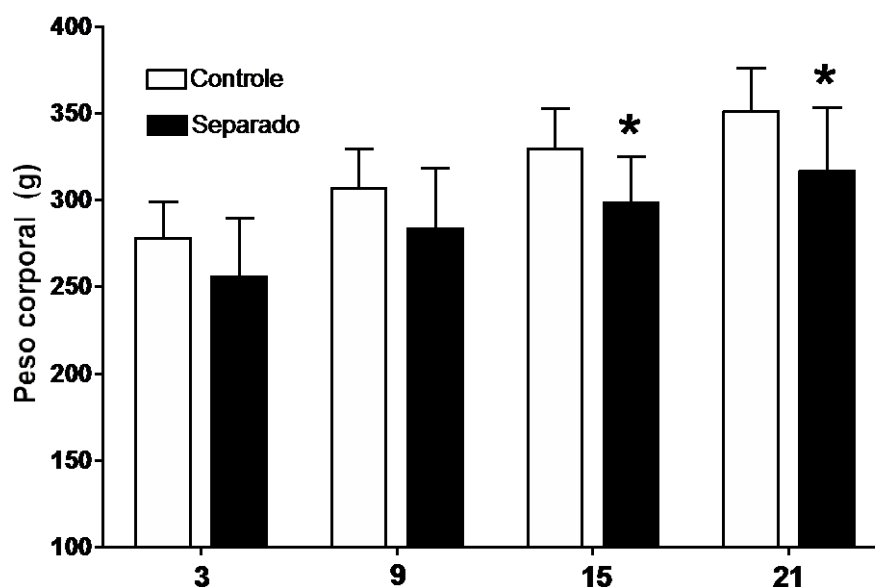


Figura 3. Efeito da separação materna sobre o peso corporal em resposta a estresse em ratos jovens. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=11) ou controle (n=12), respectivamente. O peso corporal foi obtido nos dias 63, 69, 75 e 81 de vida durante o estudo de estresse alimentar. ANOVA Two Way. Pós-teste *Bonferroni*. Dados expressos em média $\pm$ DP * $p < 0,05$.

Consumo alimentar após estresse alimentar agudo ou crônico

O estresse crônico (21 dias) aumentou a ingestão de dieta palatável comparado ao estresse agudo (3 dias) no grupo controle (C (Dia3): $0,59 \pm 0,49$ vs C (Dia 21): $1,48 \pm 0,73$, $p < 0,01$) (Figura 4A). Em animais separados não foi observada diferença entre a ingestão aguda e crônica (S (Dia 3): $1,09 \pm 0,56$ vs S (Dia 21): $1,29 \pm 0,78$, $p > 0,5$) (Figura 4B). Os animais separados consomem maior quantidade de dieta palatável após estresse agudo comparado ao controle (C (Dia3): $0,59 \pm 0,49$ vs S (Dia 3): $1,09 \pm 0,56$, $p < 0,05$) (Figura 4C). Após o estresse crônico, o grupo separado permanece ingerindo quantidades semelhantes ao controle (C (Dia 21): $1,48 \pm 0,73$ vs S (Dia 21): $1,29 \pm 0,78$, $p > 0,5$) (Figura 4D).

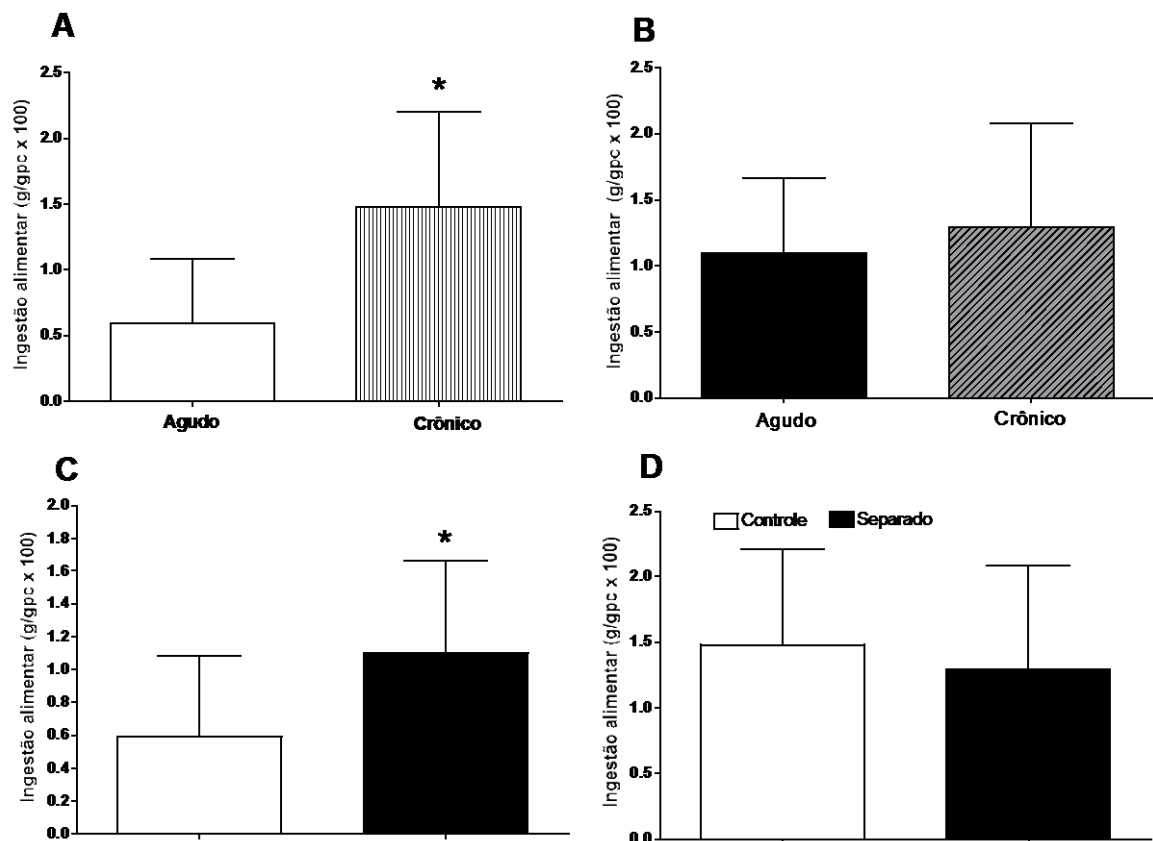


Figura 4. Efeito da separação materna sobre o consumo de Cookie após estresse agudo e crônico. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=11) ou controle (n=12), respectivamente. O consumo foi obtido nos dias 3 e 21 do estudo de estresse alimentar. Efeito do estresse agudo e crônico em animais controle (A) e separados (B). Efeito da separação sobre o consumo após estresse agudo (C) ou crônico (D). Teste *t de student*. Dados expressos em média $\pm$ DP * $p < 0,05$.

Durante o teste de estresse crônico, há menor consumo de dieta padrão no grupo separado comparado ao controle a partir do dia 19 (Dia 19: C: $26,73 \pm 4,20$ vs S: $22,20 \pm 2,94$, $p < 0,05$; Dia 20: C: $27,34 \pm 3,95$ vs S: $22,99 \pm 3,42$, $p < 0,05$; Dia 21: $28,40 \pm 2,54$ vs S: $22,81 \pm 3,31$, $p < 0,01$)(Figura 5).

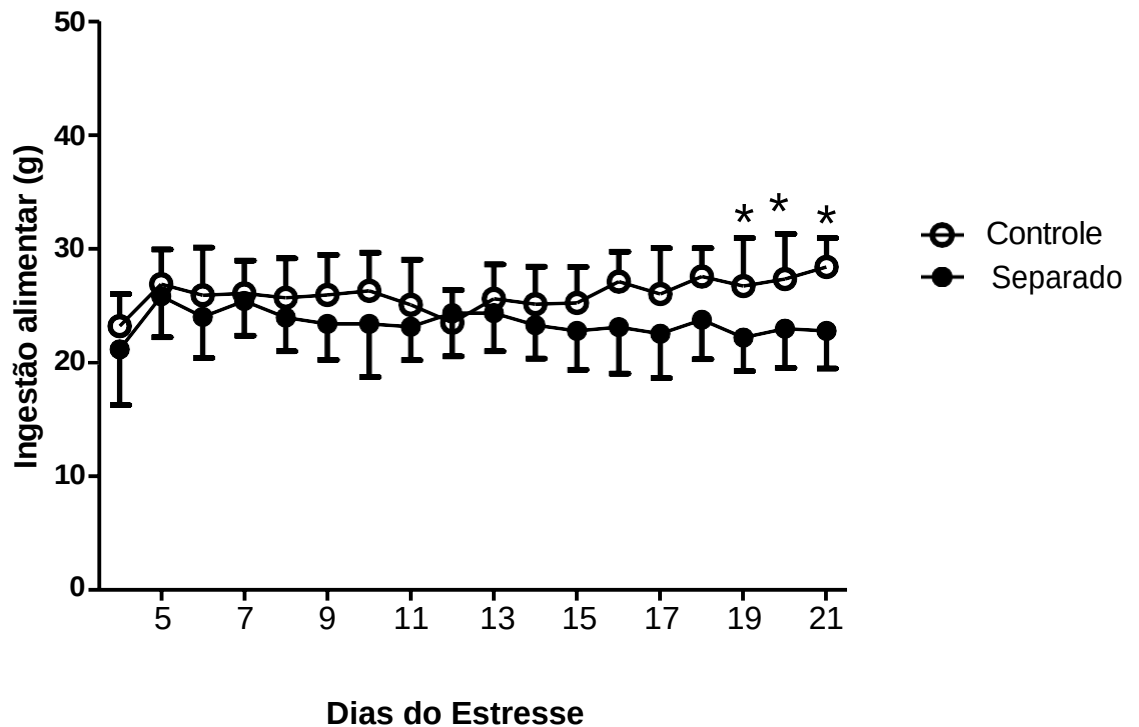


Figura 5. Efeito da separação materna sobre o consumo de dieta padrão durante o período de estresse alimentar. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=11) ou controle (n=12), respectivamente. O consumo foi obtido diariamente a partir do 4 dia do estudo de estresse alimentar. ANOVA Two Way. Dados expressos em média $\pm$ DP. Pós-teste *Bonferroni*. * $p < 0,05$.

Peso corporal de ratos do grupo 2

Não houve diferença de peso corporal entre os grupos separado e controle em todas as idades analisadas neste estudo (Figura 6).

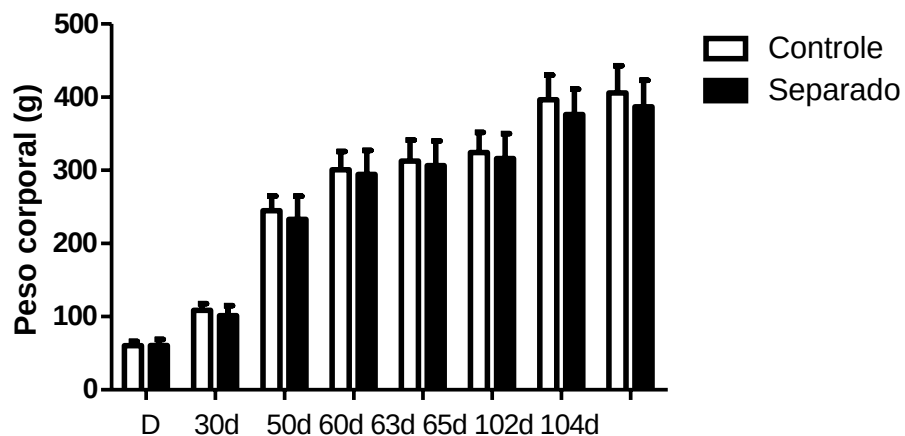


Figura 6. Efeito da separação materna sobre o peso corporal do desmame à vida adulta. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=11) ou controle (n=12), respectivamente. O peso corporal foi obtido em diferentes idades. ANOVA Two Way. Dados expressos em média $\pm$ DP.

Preferência alimentar segundo a fase de luminosidade

Houve menor ingestão de dieta padrão no segundo dia durante a fase escura em animais separados comparados aos controles (C: $7,02 \pm 7,24$ vs S: $1,03 \pm 2,01$, $p < 0,05$) (Figura 7A). Não houve diferenças na quantidade ingerida de dieta padrão na fase clara (Figura 7C), nem na ingestão de dieta palatável na fase escura (Figura 7B) ou clara (Figura 7D).

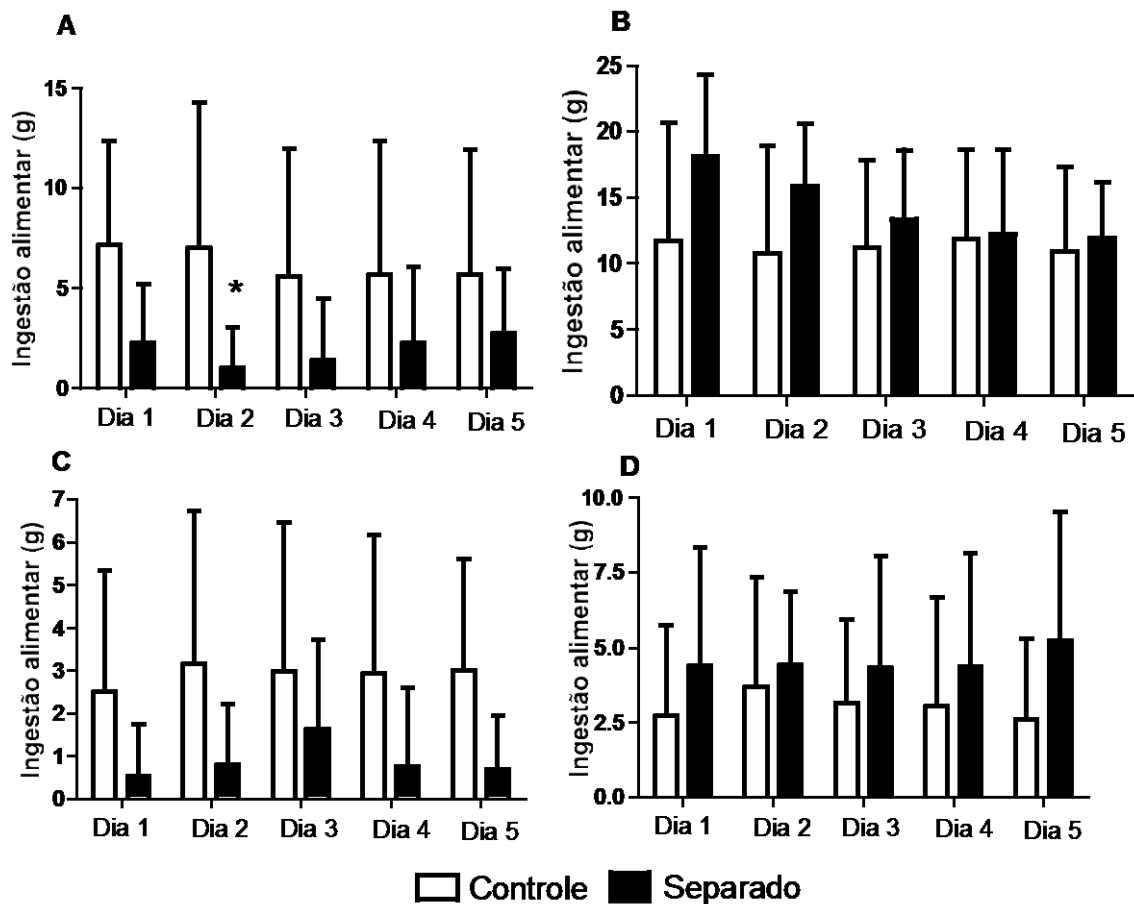


Figura 7. Efeito da separação materna sobre a preferência alimentar na fase claro ou escuro. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=12) ou controle (n=14), respectivamente. O consumo de alimento padrão ou palatável foi aferido na fase clara (C padrão, D palatável) ou escura (A padrão e B palatável) do ciclo. Two Way. Pós-teste *Bonferroni* Dados expressos em média $\pm$ DP * $p < 0,05$.

Ao analisar a adaptação do animal à dieta palatável (quota ingerida nos dois primeiros dias) houve preferência pela dieta palatável apenas durante a fase escura no grupo separado (C: $22,48 \pm 15,97$ vs S: $33,99 \pm 10,09$, $n=12-14$, $p < 0,05$) (Figura 8B). Quanto à ingestão de dieta padrão durante o período de adaptação, os animais separados apresentaram menor ingestão tanto na fase escura (C: $14,18 \pm 10,44$ vs S: $3,28 \pm 4,62$, $n=12-14$, $p < 0,01$) (Figura 8A), quanto na fase clara ($5,67 \pm 6,16$ vs S: $1,33 \pm 2,56$, $n=12-14$, $p < 0,05$) (Figura 8C).

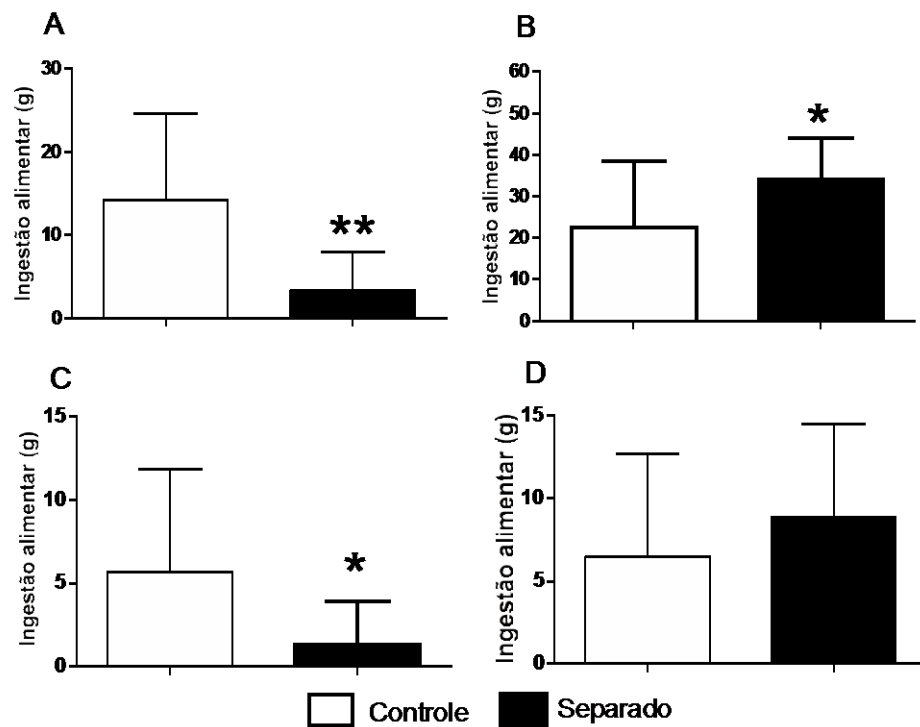


Figura 8. Efeito da separação materna sobre consumo alimentar durante a fase de adaptação a dieta palatável. Ratos foram submetidos a separação materna do 2º ao 14º dia de lactação por 3 horas diárias, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=12) ou controle (n=14), respectivamente. Dieta padrão na fase escura (A) e clara (C). Dieta palatável na fase escura (B) e clara (D). Teste t de student. Dados expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Ansiedade experimental

Os animais separados permaneceram menor tempo nos braços abertos (C: $75,07 \pm 32,58$ vs S: $24 \pm 29,98$, $p < 0,001$) (Figura 9B) e maior tempo nos braços fechados (C: $182,36 \pm 47,72$ vs S: $243 \pm 48,51$, $p < 0,005$) (Figura 9A) quando comparados aos controles .

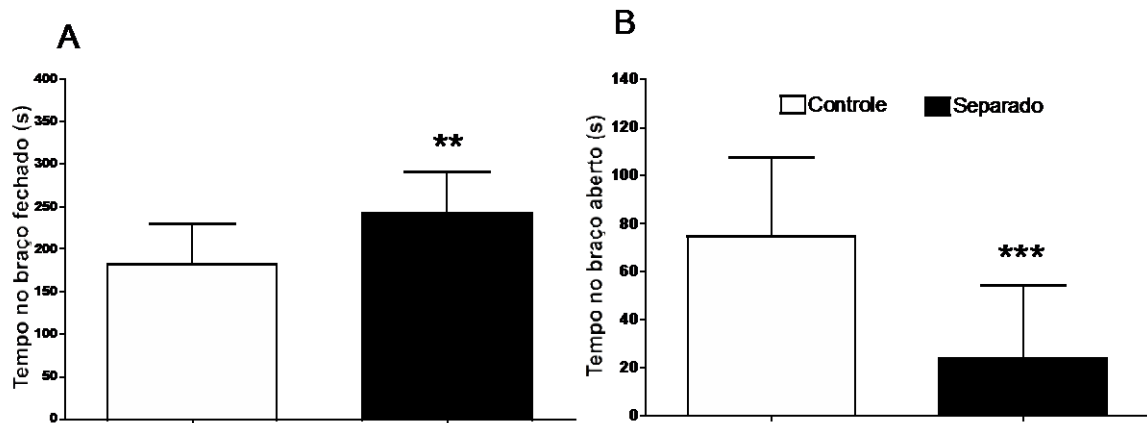


Figura 9. Efeito da separação materna sobre a ansiedade experimental. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=11) ou controle (n=14), respectivamente. Foi quantificado o tempo que o rato permaneceu no braço fechado (A) ou aberto (B) do labirinto em cruz elevado. Teste *t de student*. Dados expressos em média $\pm$ DP **p<0,005; ***p<0,001

Consumo alimentar de 24h

Não foram observadas diferenças na ingestão de dieta padrão de 24 horas durante os 3 dias de estudo entre os grupos controle e separado (Figura 10).

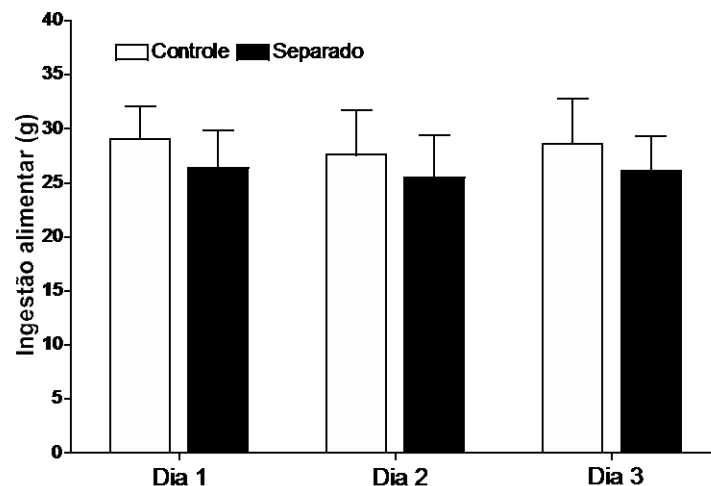


Figura 10. Efeito da separação materna sobre consumo alimentar diário. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=12) ou controle (n=14), respectivamente. Foi quantificado o consumo de dieta padrão de biotério a cada 24 horas em 3 dias consecutivos ANOVA Two Way. Pós-teste *Bonferroni*. Dados expressos em média $\pm$ DP.

Consumo após privação alimentar com ou sem fluoxetina

A privação alimentar não alterou a ingestão alimentar entre os grupos controle e separado. Após a administração de fluoxetina, houve diminuição da ingestão alimentar apenas no grupo controle (C(J): $1,62 \pm 0,63$ vs C(J+F): $1,02 \pm 0,49$, $p < 0,05$) (Figura 11).

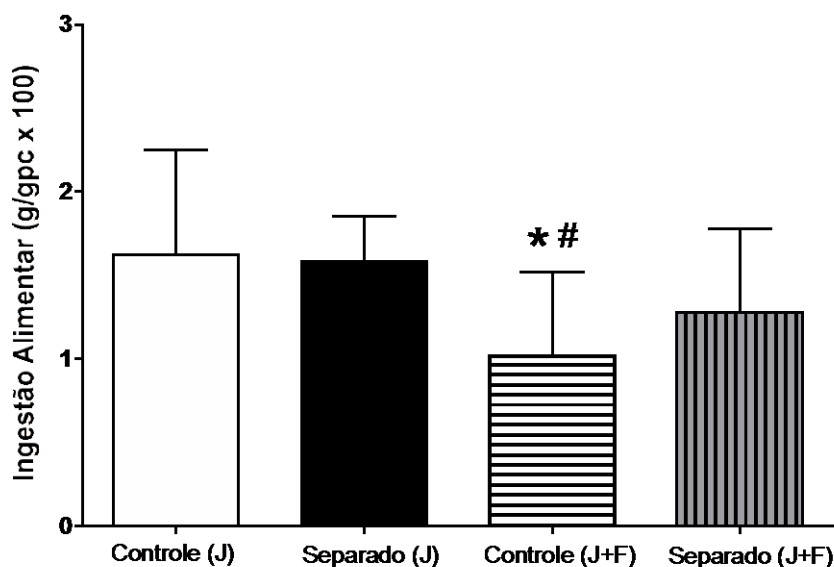


Figura 11. Efeito da separação materna sobre o consumo alimentar em resposta a jejum e/ou fluoxetina. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (n=12) ou controle (n=14), respectivamente. Foi quantificado o consumo de dieta padrão de biotério durante 1 hora após 8 horas de jejum (J), ou injeção aguda de fluoxetina (F, 10mg/Kg pc). ANOVA One Way. Pós-teste *Bonferroni*. Dados expressos em média $\pm$ DP * $p < 0,01$. *vs Controle (J); #vs Separado (J).

Experimento 2: Efeito da separação materna sobre o comportamento alimentar homeostático e sistema serotoninérgico **Peso corporal e Consumo Alimentar de 24 horas**

Não houve diferenças de peso corporal aos 35 ou 365 dias de vida (Figura 12A). O consumo alimentar não foi diferente entre os grupos controle e separado entre os dias 300 (dia1) e 302 (dia 3) de vida (Figura 12B).

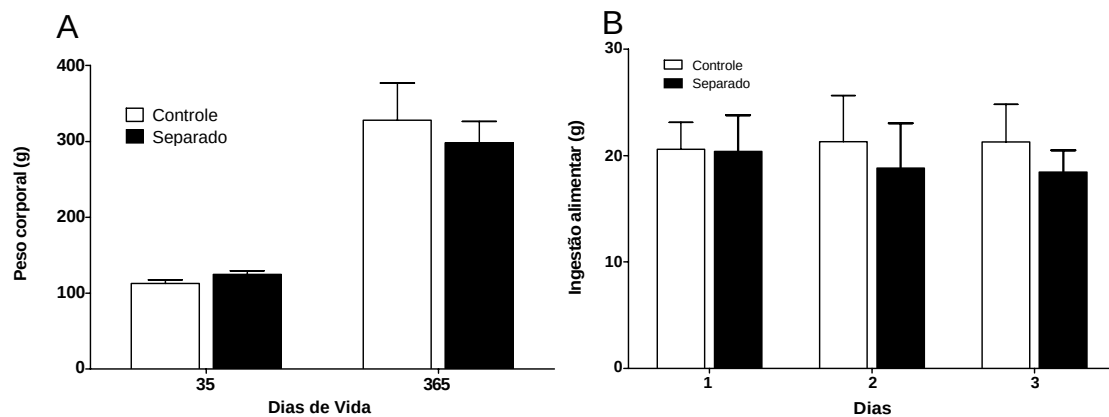


Figura 12. Efeito da separação materna sobre o peso corporal e consumo alimentar. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado ou controle, respectivamente. Foi quantificado o consumo de 24 horas de dieta padrão de biotério durante 3 dias consecutivos. O peso corporal foi aferido aos 35 e 365 dias de vida. Os dados do consumo são de fêmeas nos dias 300, 301 e 302 de vida. ANOVA Two Way. Pós-teste Bonferroni. $n=10$. Ingestão alimentar: ANOVA One Way. Pós-teste Bonferroni. $n=9$. Dados expressos em média $\pm$ DP.

Sequência Comportamental de Satedade (SCS)

Aos 35 dias não houve diferença no ponto de satedade entre os grupos controle e separado (Figura 13). Não houve diferenças na latência para iniciar a alimentação, na taxa de alimentação e no tamanho da refeição em ambos os grupos (Tabela 5). A duração da refeição foi maior ($p<0,05$) no grupo separado comparado ao controle. Não houve diferença na ingestão alimentar entre os grupos controle e separado (Tabela 5).

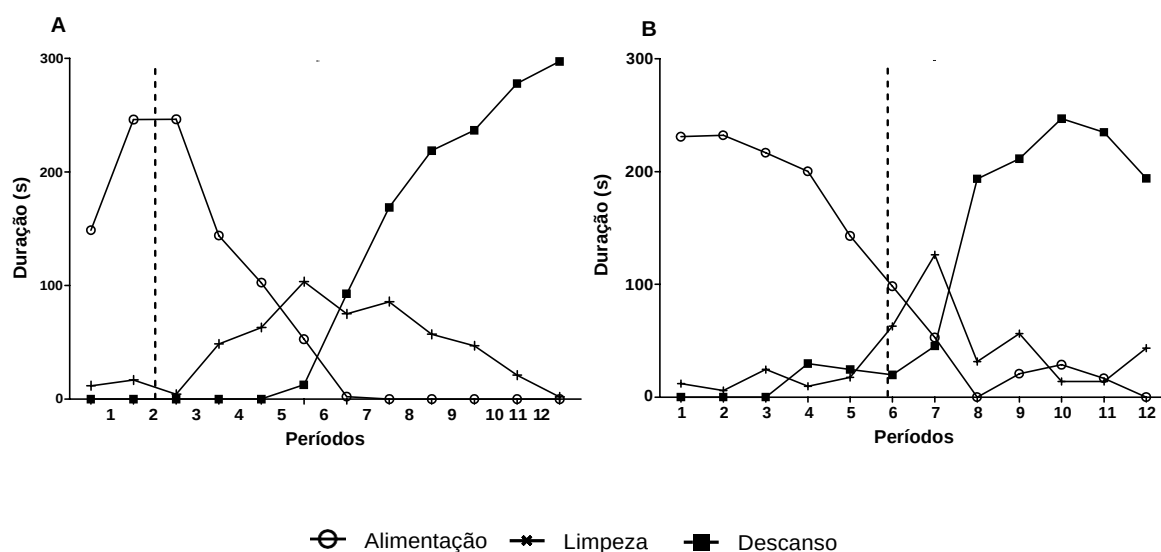


Figura 13. Efeito da separação materna sobre a sequencia comportamental de saciedade aos 35 dias de vida em fêmeas. Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado (B) ou controle (A), respectivamente. Os gráficos demonstram as frequências dos comportamentos alimentar e não-alimentares em cada período (5min/período). O ponto de saciedade é demonstrado pela linha vertical indicando o cruzamento entre as linhas representando o comportamento de alimentação e de descanso. $n=10$

Tabela 5. Parâmetros microestruturais da sequência comportamental de saciedade de ratos adolescentes (35 dias) que foram submetidos a separação materna neonatal

Parâmetros	Controle	Separado
Ingestão alimentar (g)	2.61±0.25	3.65±0.49
Latência (s)	162.20±181.15	46.60±49.02
Taxa alimentar (Kcal/min)	0.60±0.11	0.63±0.24
Tamanho da refeição (kcal/kg pc)	84.09±25.94	103.07±37.42
Duração da refeição (min)	15.71±3.82	20.67±5.63*

Dados expressos em média ± DP (Teste t de Student). *vs C. $p<0.05$

Aos 365 dias houve antecipação do ponto de saciedade no grupo separado comparado ao controle (Figura 14). Durante a SCS, houve menor ingestão alimentar (g), duração (min) e tamanho da refeição (kcal/kg de peso) no grupo separado comparado ao controle (Tabela 6). A taxa de alimentação (Kcal/min) e a latência (seg) para iniciar a alimentação não foram diferentes entre os grupos. A

administração de fluoxetina diminuiu a quantidade de dieta ingerida, a duração e o tamanho da refeição apenas no grupo controle (Tabela 6).

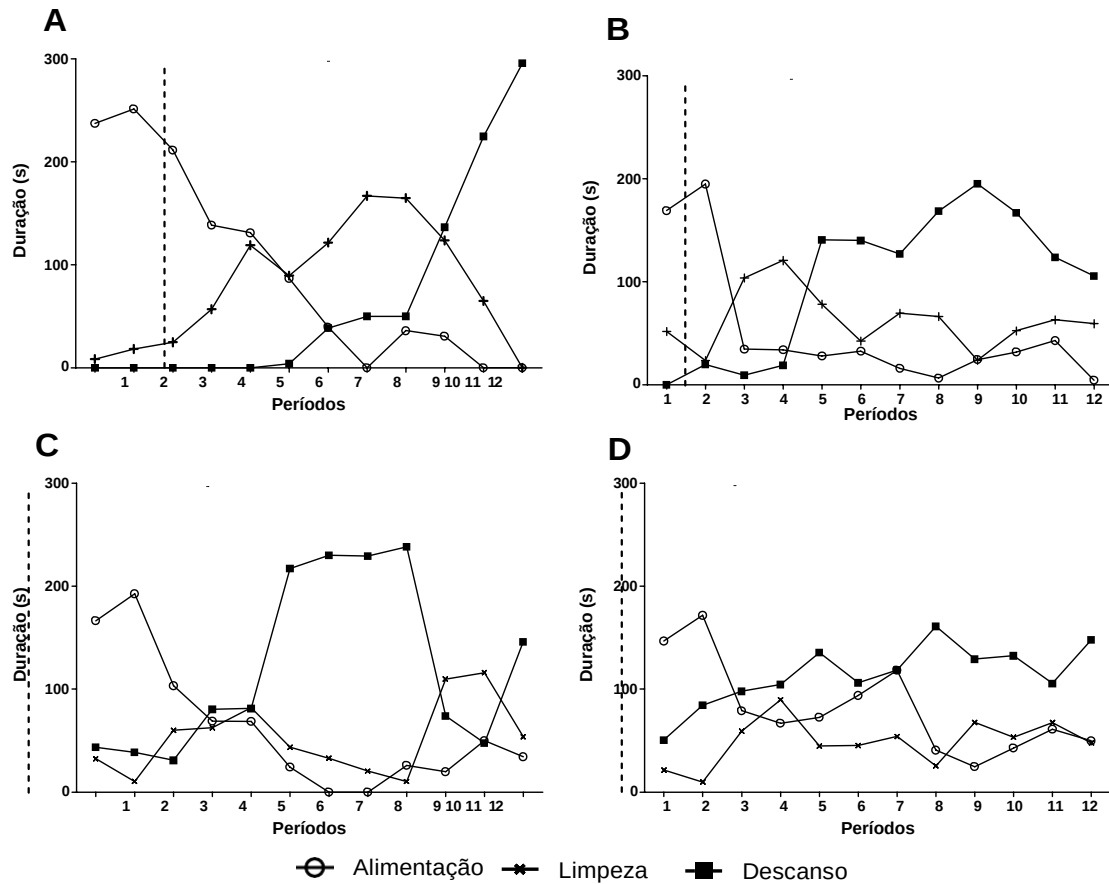


Figura 14. SCS em animais com 365 dias de vida submetidos à separação materna (B e D) ou controle (A e D). Os gráficos demonstram as frequências dos comportamentos alimentar e não-alimentares em cada período (5min/período). A e B demonstram a SCS 30min após a administração de solução salina e C e D 30min após a administração de fluoxetina. O ponto de saciedade é demonstrado pela linha vertical indicando o cruzamento entre as linhas representando o comportamento de alimentação e de descanso. Controle n=7, Separado n=6.

Tabela 6. Parâmetros microestruturais da sequência comportamental de saciedade de ratos aos 365 dias de vida que foram submetidos à separação materna neonatal

Parâmetros	Controle Salina	Separado Salina	Controle Fluoxetina	Separado Fluoxetina
Ingestão alimentar	5.11±1,15	2.42±0.85**	2.26±1.09###	2.75±1.19
Latência	49.0±27.25	104.86±104.97	204.83±294.41	285.0±373.05
Taxa alimentar	0.98±0.24	0.87±0.18	0.67±0.20	0.66±0.22
Tamanho refeição	56.19±14.59	28.80±10.78*	25.29±12.40###	31.80±11.43
Duração refeição	19.38±4,5	10.31±3,95***	12.58±5.85#	16.12±6.62

Latência (segundos), Taxa (Kcal/minuto), Tamanho (Kcal/Kg peso corporal), Duração (minutos). Dados expressos em média ± DP (Teste t de Student). *vs C. # vs C saline. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 #p<0.05, ###p<0.005

Expressão gênica dos receptores hipotalâmicos, *5ht1b* e *5ht2c*, e do transportador de serotonina (*Sert*)

A separação materna causou aumento da expressão gênica do *5ht1b* no hipotálamo de ratos separados em comparação ao controle (C: 1,00 ± 0,11 vs S: 1,96 ± 0,40) (Figura 15 A). Não houve diferença na expressão do 5HT2C (C: 1,02 ± 0,26 vs S: 1,34 ± 0,23) (Figura 15 B) ou SERT (C: 1,00 ± 0,10 vs S: 1,09 ± 0,43) (Figura 15 C).

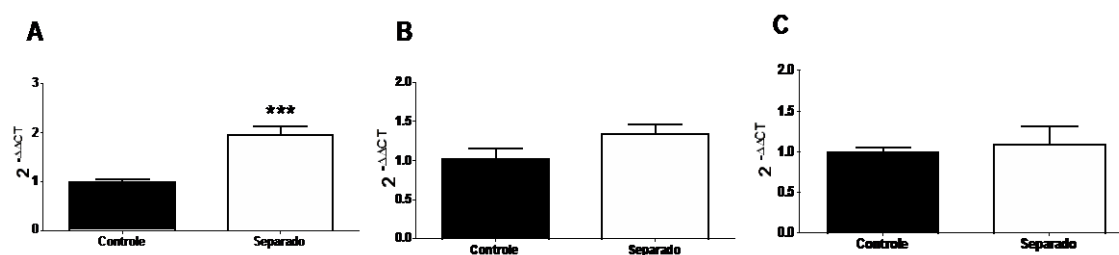


Figura 15. Efeito da separação materna sobre a expressão dos receptores serotoninérgicos *5ht1b* (A) e *5ht2c* (B) e *Sert* (C). Ratos foram submetidos a separação materna do 2 ao 14 dias de lactação por 3 horas dia, ou mantidos com suas mães durante toda a lactação, formando os grupos separado ou controle, respectivamente. Na idade adulta (440 dias), foi avaliada a expressão gênica no hipotálamo. Teste t de Student. n=4-5. Dados expressos em média ± DP. *** vs C (p<0.001).

Experimento 3: Efeito da separação materna sobre o comportamento alimentar hedônico e sistema dopaminérgico

Os resultados do experimento 3 encontram-se descritos no apêndice 1 no final desta tese em forma de artigo publicado na revista *Appetite* (ISSN: 0195-6663), volume 123, sob o título “Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males”.

6 DISCUSSÃO

Experimento 1. Separação materna neonatal e comportamento alimentar

O presente estudo demonstrou que a separação materna nas duas primeiras semanas de vida programa a resposta ao estresse em longo prazo com consequências diretas sobre o comportamento alimentar. No grupo que experimentou a soma de exposição precoce (separação materna) e tardia (eslimentar) ao estresse houve maior ingestão de alimento rico em carboidratos após estresse agudo e menor ingestão após a exposição crônica. Com relação à ingestão de dieta padrão durante o período de estresse tardio, os animais separados diminuem a sua ingestão após exposição crônica ao estresse. A diminuição na ingestão após estresse crônico foi acompanhada por perda de peso nos animais separados. Também foi demonstrado, com outra dieta palatável, rica em lipídios e carboidratos, que se a exposição ocorrer na ausência de um estressor os animais separados não demonstram preferência pela dieta palatável. Além disso, o estressor só tem efeito se a dieta for palatável, uma vez que a privação alimentar por 8h não alterou a ingestão de dieta padrão no grupo separado. E mais, não foi observada diferença quanto à ingestão de dieta padrão na ausência de um estressor. Também foi demonstrado que a separação materna está associada a maiores níveis de ansiedade. Esses efeitos comportamentais podem estar associados a disfunções do sistema serotoninérgico uma vez que a separação materna produziu um fenótipo do comportamento alimentar resistente à ação da fluoxetina na dose utilizada.

O estresse alimentar é um estresse moderado baseado na perda de controle sobre as circunstâncias, uma vez que permite ao animal o acesso a informações olfativas e visuais sem, contudo, permitir o acesso ao alimento (CIFANI *et al.*, 2009). Uma vantagem desse modelo de estresse é que a privação alimentar não é

requerida para induzir a alimentação. Assim, pode-se dizer que o animal aumentou a ingestão não porque estivesse com fome, mas devido ao estresse. As mudanças observadas no grupo separado durante a lactação demonstram que a exposição ao estresse nesse período da vida é um importante fator na determinação da habilidade tardia em lidar e superar o estresse. Os achados presentes com relação à ingestão de cookies nos dias 3 e 21 sugerem uma inabilidade do grupo separado em distinguir entre estresse agudo e crônico. No dia 3 os animais separados ingeriram, no período de 1h, quase duas vezes a quantidade consumida pelos animais controle. A resposta aguda ao estresse inclui a supressão da ingestão alimentar (YAU e POTENZA, 2013). Após a exposição a um agente estressor a ativação do sistema nervoso simpático inicialmente e, posteriormente, a liberação de glicocorticoides promove mobilização energética e alterações cardiovasculares que favorecem a reação de luta ou fuga. A ingestão alimentar neste momento não é compatível com essa resposta e, portanto, é inibida (YAU e POTENZA, 2013). Contudo, a exposição crônica ao estresse tende a aumentar a ingestão alimentar em situações de estresse agudo, especialmente se o alimento é palatável, ou seja, rico em gordura e açúcar (YAU e POTENZA, 2013). Portanto, esses dados sugerem que a separação materna produziu um fenótipo de comportamento alimentar, no dia 3 (estresse agudo), similar àquele que se observa após exposição crônica ao estresse.

Talvez o fator determinante para a geração de consequências negativas neste modelo é a imposição ao agente estressor durante o período de desenvolvimento e o tipo de estresse que a separação materna representa. Tem sido proposto que há um período durante as duas primeiras semanas de vida, em ratos, no qual os animais são hiporresponsivos ao estresse. Nesse período, os ratos apresentam capacidade de secreção da corticosterona reduzida em resposta a vários estímulos estressores (SAPOLSKY e MEANEY, 1986). As consequências deletérias da corticosterona no período de desenvolvimento, tais como a hipertensão e a diabetes em longo prazo, justificam esta resposta reduzida a vários agentes estressores (VARGA, 2013). A presença da mãe é essencial para a manutenção dessa resposta suprimida uma vez que provê estimulação tátil, alimentação e contato passivo ao filhote, fatores importantes para essa inibição (LEVINE, 2002). Os achados presentes indicam que a separação materna durante os primeiros dias de vida pode ter submetido os animais ao estresse precocemente modulando a resposta tardia à

uma situação estressora. De fato, vários estudos têm demonstrado a necessidade de uma segunda exposição a um agente estressor mais tarde para que os efeitos deletérios do estresse experimentado durante o desenvolvimento sejam vistos (HILL, KISS VON SOLY, *et al.*, 2014; LESSE, 2016).

Após 21 dias de exposição ao estresse, a separação materna não alterou a ingestão alimentar dos animais, ao contrário do grupo controle, o qual mais do que duplicou a quantidade consumida no dia 3. A ativação do eixo HPA por um agente estressor produz um aumento na gliconeogênese, na glicogenólise, na lipólise e na proteólise e suprime as ações anabólicas do hormônio do crescimento, da insulina e dos esteroides sexuais nos seus órgãos-alvo, ou seja, repostas adaptativas à situação estressora. A persistência do agente estressor, no entanto, torna essas respostas prejudiciais. Há aumento da adiposidade, supressão da atividade osteoblástica, declínio da massa magra e desenvolvimento de resistência à insulina (CHROUSOS, 2000). Portanto, o aumento da ingestão no dia 21 no grupo controle sugere um aumento do catabolismo gerado pela exposição crônica ao estresse. Ao contrário, o grupo separado demonstrou uma inabilidade de ajustar o comportamento alimentar no sentido das demandas energéticas aumentadas. Isso se refletiu na diminuição da ingestão alimentar e consequente perda de peso a partir do dia 15 de estresse.

O alimento ofertado no estresse alimentar é rico em carboidratos, macronutrientes que conferem sabor doce ao alimento. Estudos que avaliam o consumo e/ou a preferência por soluções de sabor doce têm demonstrado que a separação materna influencia a percepção desse sabor que é naturalmente palatável para os animais (MICHAELS e HOLTZMAN, 2007). As variações na ingestão das soluções adocicadas oferecidas a esses animais podem representar prejuízos na quantidade e/ou atividade de receptores para o sabor doce como também no próprio limiar para a percepção desse sabor. Muitos camundongos que parecem não preferir o doce o fazem quando a concentração de sacarose é aumentada (SCLAFANI, 2006). A qualidade na percepção do sabor doce envolve a proteína heterodimérica T1R2/T1R3, um quimiorreceptor para a percepção dos açúcares e adoçantes presentes na cavidade oral, intestino, pâncreas, fígado, tecido adiposo e estruturas do sistema nervoso central (MUROVETS *et al.*, 2014). Sua distribuição difusa permite a integração das informações referentes à percepção gustatória àquelas referentes ao estado energético (MUROVETS *et al.*, 2014). Ainda

não se sabe se o estresse precoce modifica os níveis dessas proteínas ou sua atividade, mas o fenótipo observado em animais *knockout* para o gene que codifica o T1R3, com desaparecimento da preferência pela sacarose (MUROVETS *et al.*, 2014), sugere que possíveis alterações nessas proteínas poderiam influenciar a maior ou menor preferência por alimentos ricos em carboidratos nos animais separados.

Vale a pena ressaltar que o aumento na ingestão alimentar observado tanto para o alimento palatável (Cookies) quanto para a dieta padrão após estresse crônico no grupo controle sugere que o aumento ocorreu de maneira a compensar uma maior demanda energética. O grupo separado, por outro lado, aumentou apenas a ingestão do alimento palatável após o estresse agudo sugerindo que o Cookie foi ingerido visando trazer conforto para a ansiedade causada pelo estresse alimentar. Como citado anteriormente, o alimento ofertado no estresse alimentar é rico em carboidratos. Dietas ricas em carboidratos aumentam a proporção triptofano/LNAA (Large Neutral Aminoacids) (LYONS e TRUSWELL, 1988) e aumentam a absorção de triptofano, precursor da serotonina, pelo cérebro (FERNSTROM e WURTMAN, 1972). Considerando que a serotonina melhora o humor (YOUNG, 2007), a maior ingestão do alimento rico em carboidratos após o estresse alimentar pode representar uma tentativa de aliviar os efeitos negativos do estresse. Isso justificaria a ausência de efeitos com relação à dieta padrão. Por não oferecer atrativos, a saber, grandes quantidades de açúcares e gorduras, a dieta padrão não foi ingerida em quantidades maiores. No presente estudo, no entanto, o mecanismo pelo qual o alimento palatável aliviaria os efeitos negativos do estresse não foi investigado. Por outro lado, evidências de outros trabalhos sugerem a possibilidade do cookie ter sido ingerido com essa finalidade. Foi sugerido que, em situações de estresse, alimentos palatáveis são ingeridos não como alimentos, ou seja, supridores de nutrientes essenciais à sobrevivência. Ao contrário, esses alimentos são ingeridos para trazerem conforto (ORTOLANI *et al.*, 2014), uma função similar àquela exercida por algumas drogas. Portanto, a maior ingestão de cookies após o estresse alimentar sugere que o alimento foi ingerido para aliviar o estresse e justifica a ausência de diferenças na ingestão de dieta padrão.

Nesse contexto, foi conduzida a análise da ingestão de dieta padrão após estresse agudo representado pela privação alimentar de 8h. Não foi observado aumento na ingestão do grupo separado após o período de jejum sugerindo que o

estresse só está associado à maior ingestão se o alimento for palatável ou se a exposição ao agente estressor for crônica e intensa. Algumas análises da ingestão de dieta padrão têm sido associadas a manipulações prévias. Alguns exemplos incluem a análise do consumo durante ciclos de alimentação e jejum, ou após 23 horas de jejum, ou após 22 horas de jejum associadas a exercício físico (PENKE, 2002; HANCOCK e GRANT, 2009; RYU *et al.*, 2009; YOO *et al.*, 2011). Nesses estudos evidencia-se que a separação materna induz modificações do comportamento alimentar quando há exposição a situações adversas na vida adulta. Foi observado que durante os ciclos de alimentação e jejum os animais separados consumiram mais que seus controles nos dias de realimentação (RYU *et al.*, 2009). Por outro lado foi observado que não houve diferenças na ingestão após 23 horas de jejum associado ou não ao exercício físico (HANCOCK e GRANT, 2009). Essas diferenças podem ser devido à gravidade e ao período de exposição ao agente estressor. Observando-se as diferenças na ingestão entre o grupo separado e controle, submetidos aos ciclos de alimentação e jejum, foi demonstrado que, a partir do quarto dia de realimentação, houve maior consumo de dieta padrão pelos animais separados (RYU *et al.*, 2009), sugerindo que a gravidade das 24h de jejum é reforçada pela exposição repetida a ela. Níveis aumentados do neuropeptídeo orexigênico NPY foram observados apenas ao final do experimento demonstrando que esse aumento também parece ter sido desenvolvido pela exposição repetida aos ciclos de jejum e alimentação (RYU *et al.*, 2009). Deve-se salientar que no estudo que não observou influência da separação sobre a ingestão as avaliações foram realizadas cerca de 24h após o insulto, o que pode ter sido muito cedo (HANCOCK e GRANT, 2009). Em outro estudo a hiperfagia foi observada apenas após 6 dias de restrição alimentar (hiperfagia de rebote), durante o período de restrição não foram observados efeitos da separação sobre o consumo (IWASAKI *et al.*, 2000). Assim, as 8h de jejum a que os animais foram submetidos no presente estudo sugerem que o estresse leve e agudo não promove alterações do consumo de dieta padrão.

Portanto, o alimento palatável pode representar uma tentativa dos animais separados de aliviar a ansiedade (PECORARO, NORMAN *et al.*, 2004). A ansiedade é uma reação normal ao estresse, caracterizada por sentimentos de preocupação e medo (WALF, 2007). A aversão exagerada pelos braços abertos, no grupo controle, sugere que este grupo vivencia a ansiedade excessivamente. É interessante notar

que essa resposta aparece sem nenhum estímulo antes do teste de ansiedade no labirinto. Assim, a maior ansiedade apresentada pelo grupo separado está diretamente relacionada à experiência vivenciada no início da vida. A separação materna também está associada a expressão exagerada do comportamento denominado, em inglês, *licking-grooming* (LG), que significa lambe o filhote demonstrando cuidado. Esse comportamento se exacerba nas horas sucessivas à reunião da mãe aos filhotes após o período de separação (MACRI *et al.*, 2004). Essa alteração comportamental por parte das mães sugere que a separação materna também é um estressor para as mães. De fato, foi demonstrado que as mães de filhotes separados apresentam maiores níveis de corticosterona, de RNAm para o Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) e expressão reduzida de RNAm para o receptor de glicocoticoide (GR) no hipocampo sugerindo alteração no eixo mediador da resposta ao estresse. Essas mães apresentaram maiores níveis de ansiedade sugerindo que mães ansiosas devido à separação aumentam os cuidados direcionados aos filhotes representado pelos maiores níveis do LG (MACRI *et al.*, 2004). O mesmo grupo de pesquisa observou que os filhotes separados apresentam as mesmas alterações observadas nas mães com relação aos níveis de corticosterona, CRH, GR e ansiedade sugerindo que o binômio mãe-filhote é afetado da mesma forma pela separação. O cuidado exagerado ofertado pelas mães aos filhotes, embora possa contribuir para mitigar os efeitos do estresse, também pode contribuir para desenvolver filhotes mais ansiosos. Foi sugerido que a mãe, sendo aquela que sai do ninho para procurar alimentação, experimenta o ambiente com todas as suas adversidades de maneira que, naqueles ambientes mais adversos, o maior cuidado direcionado por essas mães aos filhotes é uma maneira de traduzir o ambiente para eles tornando-os mais cautelosos na vida adulta, na interação com este ambiente (CHAMPAGNE e MEANEY, 2001). Assim, a maior ansiedade demonstrada pelos animais pode sugerir uma maior precaução com relação ao estímulo negativo que a permanência nos braços abertos representa, ou seja, exposição ao precipício.

Diferente do grupo que foi submetido ao estresse em dois períodos distintos da vida, o estudo do comportamento alimentar também foi conduzido em animais que experimentaram o estresse apenas no início da vida, pela separação materna. Neste grupo é possível observar a ação direta do estresse precoce sobre o comportamento alimentar tardio. Foi demonstrado que a exposição a uma dieta

palatável na ausência de um agente estressor associado não altera a preferência dos animais pela dieta palatável. E mais, não foi observada diferença quanto à ingestão de dieta padrão na ausência de um estressor. Esses efeitos comportamentais podem estar associados a disfunções do sistema serotoninérgico uma vez que a separação materna produziu um fenótipo resistente à ação da fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), nesses animais.

Estudos têm demonstrado que a separação materna promove hiperresponsividade ao estresse aumentando a resposta da corticosterona (KALINICHEV *et al.*, 2002; LUNDBERG *et al.*, 2017). Assim, parece que esses animais são mais reativos ao estresse, na sua ausência, no entanto, se comportam como os animais controle. Níveis basais de corticosterona foram semelhantes entre os animais separados no início da vida e aqueles que permaneceram com suas mães (EILAND, 2012) sugerindo que esses animais só demonstram alterações durante uma segunda exposição a uma situação adversa. Esses achados reforçam a ideia de que há a necessidade de uma segunda experiência com o estresse para que a “programação” ocorrida na lactação apareça (HILL, KLUG, *et al.*, 2014). Assim, a ausência de diferenças significativas na ingestão durante o teste de preferência alimentar pode ser devido à ausência de um estressor simultâneo durante o período de teste. No entanto, embora não tenha havido maior ingestão de dieta palatável quando comparado ao grupo controle, a recepção da dieta palatável foi diferente entre os grupos. A comparação entre a preferência alimentar entre os 2 primeiros dias (período de adaptação à dieta) e os 3 últimos demonstra que os animais separados, inicialmente, ingerem mais dieta palatável e vão diminuindo paulatinamente até o 5º dia. Os animais controles ingerem quantidades semelhantes de dieta palatável em todos os dias. Num primeiro momento, a dieta palatável parece ser mais atrativa para o grupo separado do que para o grupo controle. Foi demonstrado que animais separados são mais impulsivos (GONDRÉ-LEWIS *et al.*, 2016). A impulsividade pode ser definida como “uma predisposição para reações rápidas e não planejadas a estímulos internos ou externos sem levar em conta as consequências negativas dessas reações ao indivíduo impulsivo ou a outros”(MOELLER *et al.*, 2001). A alta impulsividade aumenta a propensão ao desenvolvimento de ingestão descontrolada de alimentos palatáveis (VELAZQUEZ-SANCHEZ *et al.*, 2014). Assim, a maior ingestão no período de adaptação comparado aos outros dias pode indicar uma maior impulsividade com relação ao

estímulo da dieta palatável em animais separados. Em contrapartida, a dieta padrão, por não apresentar atrativos em sua composição, não esteve associada a nenhuma alteração no seu padrão de consumo como demonstrado nos 3 dias de análise da ingestão de 24h.

Essas alterações comportamentais parecem estar associadas a disfunções do sistema serotoninérgico. A serotonina está associada à mediação da resposta ao estresse em longo prazo (DANIELS *et al.*, 2004). A fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, possui efeitos anorexigênicos (WONG, 1989), mas o grupo separado demonstrou hiporresponsividade aos efeitos da droga após estresse de privação alimentar. Embora o estresse de privação alimentar não tenha causado hiperfagia em relação à dieta padrão, ele demonstra que os animais são resistentes à ação anorética da fluoxetina e, portanto, eles comem mais do que deveriam comer após a administração da droga. Mais uma vez, os achados sugerem que o estresse promove o aumento da ingestão de alimentos com características que proporcionam conforto, como açúcares e gordura (ORTOLANI *et al.*, 2014), e a dieta padrão não se encaixa nesse perfil. A resistência à ação anorética da droga, por outro lado, sugere que a separação promove alterações nos circuitos que regulam o comportamento alimentar e o gasto energético e essas alterações podem levar a um estado de resistência à inibição da ingestão alimentar e ao balanço energético positivo, sobretudo em situações adversas, como a privação alimentar. Projeções do núcleo arqueado hipotalâmico (ARC) para o núcleo dorsomedial (DMH), importantes na regulação da ingestão alimentar, se desenvolvem cedo e já estão presentes no dia 6 pós-natal enquanto que as projeções do núcleo paraventricular já são identificadas no dia 8 (BOURET *et al.*, 2004). Em roedores, há um aumento dos níveis de leptina por volta do 5º dia pós-natal atingindo um pico entre os dias 9 e 10 (GRANADO *et al.*, 2012). Nessa idade, a leptina parece agir mais como um fator trófico para o desenvolvimento hipotalâmico, incluindo o aumento da densidade e tamanho dos axônios do núcleo arqueado (GRANADO *et al.*, 2012). Níveis circulantes de leptina diminuídos foram encontrados após 4 horas de separação materna intensificando-se após 8 horas de separação no 8º dia, somado a níveis aumentados de corticosterona (SCHMIDT *et al.*, 2006). Isso sugere que a separação materna antes do dia 14 pós-natal pode afetar o desenvolvimento das vias reguladoras do comportamento alimentar, envolvendo os núcleos arqueado, dorsomedial e paraventricular, colocando as duas primeiras semanas em roedores

como um período crítico para a ação de um estressor sobre o comportamento alimentar.

Em conjunto, estes achados indicam que o estresse por separação materna apresenta consequências duradouras sobre o comportamento alimentar. Além disso, os efeitos tardios do estresse no início da vida são mais bem observados após uma segunda exposição ao estresse.

Experimento 2: Efeito da separação materna sobre o comportamento alimentar homeostático e sistema serotoninérgico

Este estudo demonstrou que a separação materna antecipa o disparo da saciedade avaliado na Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) em ratas. Esses efeitos foram observados apenas em animais com idade avançada. E mais, apenas o receptor serotoninérgico 5ht1b apresentou maior expressão gênica enquanto que o receptor 5ht2c e o transportador serotoninérgico (Sert) não apresentaram alterações na sua expressão.

Inicialmente, é importante ressaltar que o estudo do comportamento alimentar através da SCS permite avaliá-lo em seus diferentes aspectos que sobrepõem a ingestão alimentar. Um comportamento tão complexo quanto esse não pode ser estudado de maneira simplista, por exemplo, considerando apenas a ingestão alimentar. Fatores sociais, idade, período do dia dentre outros fatores influenciam a ingestão alimentar e a saciedade (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Estudos em animais permitem avaliar aspectos diversos como motivação para comer, frequência de refeições, momento da saciação, dentre outros. A SCS é um bom instrumento para alcançar esse propósito. Animais privados de alimentação apresentam uma sequência de comportamentos na qual a saciação conduz a uma transição da alimentação para a limpeza, desta para a exploração do ambiente e, finalmente, para o descanso. Assim, a SCS pode prover informações referentes ao processo de saciedade, se ele ocorre por um processo fisiológico, a saciação, um distúrbio fisiológico, como a diminuição da atividade física ou contaminação alimentar (RODGERS *et al.*, 2010). Portanto, a utilização da SCS no presente estudo pôde caracterizar os efeitos da separação materna sobre a saciedade como um processo fisiológico além de oferecer informações importantes associadas ao consumo alimentar como a latência para iniciar a alimentação, o tamanho e duração da refeição e a taxa de alimentação.

A separação materna não alterou o peso corporal em nenhuma das idades avaliadas. De modo semelhante, outros autores não observaram mudanças no peso corporal dos animais separados após o desmame (RYU *et al.*, 2009; ZIMMERBERG e SAGESER, 2011). Aparentemente, uma possível exposição ao hormônio catabólico corticosterona, durante o período de desenvolvimento, não afeta significativamente a evolução ponderal dos animais. A separação materna está associada a expressão exagerada do comportamento denominado, em inglês, *licking-grooming* (LG), que significa lambido o filhote demonstrando cuidado. Esse comportamento se exacerba nas horas sucessivas à reunião da mãe aos filhotes após o período de separação (MACRI *et al.*, 2004). Portanto, uma possível compensação da mãe no cuidado direcionado aos filhotes pode ter mitigado os efeitos do estresse. Por outro lado, tem sido demonstrado que a associação de um segundo agente estressor, como o isolamento social, promove o ganho ponderal associado à hiperfagia de rebote sugerindo que esses animais podem ter alguma alteração na taxa metabólica que apenas aparece após uma segunda experiência com o estresse (RYU *et al.*, 2009). Portanto, embora as fêmeas separadas não apresentem mudanças no peso corporal, não é possível descartar completamente o impacto da separação materna sobre parâmetros que influenciam o peso corporal, como a taxa metabólica.

A separação materna não teve efeitos sobre o disparo da saciedade avaliado pela SCS (momento em que o animal diminui a ingestão e aumenta o descanso), nem sobre a latência para iniciar a alimentação, ou a taxa de alimentação ou o tamanho da refeição na análise realizada aos 35 dias de idade. Estudos apontam o efeito do tempo nos resultados da separação materna, de maneira que, em algumas situações, os efeitos do estresse no início da vida aparecerão apenas em longo prazo (MILLER *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2014). Nesse sentido, 35 dias poderia ser muito cedo para os efeitos da separação materna serem observados. Contudo, mesmo nessa idade, os animais separados despenderam um maior tempo se alimentando durante a SCS. Foi demonstrado que apenas fêmeas, em oposição aos machos, são mais propensas a desenvolver hiperfagia de rebote após um período de restrição alimentar e que esse efeito rebote apareceu apenas a partir da sexta semana de vida (IWASAKI *et al.*, 2000). Isso poderia explicar a ausência de efeitos aos 35 dias. Assim, a maior duração da refeição sugeriria uma tendência a maior ingestão alimentar mais tarde. No entanto, a hiperfagia observada no estudo citado

foi observada após um longo período de restrição alimentar (IWASAKI *et al.*, 2000). Uma vez que a restrição alimentar antes da realização da SCS foi apenas de 4h, os efeitos podem não ter sido evidentes. Por outro lado, os resultados demonstrados aos 365 dias indicam que a senescência está associada ao decréscimo do consumo alimentar ao invés de aumento.

O presente estudo demonstrou que a separação materna diminui a ingestão alimentar e antecipa o ponto de saciedade apenas em fêmeas aos 365 dias. Parece contraditório, uma vez que o esperado seria que os animais ingerissem uma quantidade maior de dieta considerando o período de 4h de jejum antes da SCS. Na literatura tem sido descrito que o jejum aumenta os níveis plasmáticos de grelina (MULLER *et al.*, 2002), conhecido como o hormônio da fome (PRADHAN *et al.*, 2013). Portanto, os achados deste experimento sugerem que a separação materna afeta os mecanismos responsáveis pela regulação da fome e da saciedade, como os níveis de grelina. Altos níveis de grelina aumentam a expressão dos receptores serotoninérgicos 5ht1b e 5ht2c no hipotálamo e drogas que aumentam a concentração de serotonina, como a fenfluramina, diminuem os níveis plasmáticos do hormônio. Assim, tem sido sugerido que há um *feedback negativo* via ação desses receptores sobre os níveis plasmáticos de grelina (NONOGAKI *et al.*, 2006). É interessante observar que os animais separados demonstraram maior expressão do receptor 5ht1b no hipotálamo. Além disso, a realimentação após o período de jejum é capaz de promover a liberação de serotonina levando à diminuição da ingestão alimentar (NECTOW *et al.*, 2017). Portanto, esses achados sugerem que a maior expressão do 5ht1b no hipotálamo observada neste estudo poderia estar envolvida tanto no feedback negativo sobre a grelina quanto numa possível hiperatividade na liberação de serotonina após a realimentação. Ambos os efeitos explicariam a hipofagia observada nos animais separados. Ademais, a análise de 24h não demonstrou alterações na ingestão alimentar indicando que o decréscimo do consumo pode ter ocorrido em resposta ao jejum e realimentação durante o período anterior e durante a SCS.

A análise dos parâmetros da SCS demonstram que a menor ingestão alimentar ocorreu devido à menor duração da refeição com uma consequente diminuição do tamanho da refeição. Como mencionado no parágrafo anterior, uma possível liberação de serotonina após a realimentação agindo sobre uma grande concentração de receptores 5ht1b explicaria um menor tempo despendido no

comportamento de alimentação. Ademais, um possível aumento nas concentrações de grelina após o período de jejum poderia ter disparado o *feedback negativo* via ação do receptor 5ht1b (NONOGAKI *et al.*, 2006) e agido sinergisticamente para inibir a ingestão. Essa ideia é reforçada pela observação da taxa de alimentação e da latência para iniciar a refeição, as quais não diferiram entre os grupos. A taxa de alimentação, definida como as calorias ingeridas por minuto (LIRA *et al.*, 2014), demonstra que esses animais não têm uma fome voraz e a latência demonstra que ele não são mais ansiosos pela dieta mas se comportam de maneira semelhante ao grupo controle.

A administração de fluoxetina antes da SCS demonstrou que não há diferenças entre os grupos quanto à ação da droga. A análise intragrupo, no entanto, revelou que apenas os animais controle diminuíram sua ingestão após a administração da fluoxetina comparado à administração de solução de NaCl a 0,9%. Portanto, esses resultados demonstram que as fêmeas separadas expostas a elevados níveis de serotonina, por ação da fluoxetina, não alterarão a resposta que elas demonstram antes da aplicação da droga, ou seja, a separação materna promove um fenótipo semelhante àquele que os animais controle apenas demonstram após a administração da droga anorética fluoxetina. A fluoxetina age inibindo a recaptação de serotonina pelo seu transportador. Assim, a serotonina permanece por mais tempo na fenda sináptica para agir nos receptores pós-sinápticos (UMEHARA *et al.*, 2016). Neste estudo, nenhuma alteração foi observada na expressão do transportador serotoninérgico. Portanto, infere-se que a ação da fluoxetina foi similar em ambos os grupos de maneira que tanto os animais controle quanto os separados foram expostos a níveis similares de serotonina em resposta à inibição de sua recaptação pelo fármaco. Por outro lado, foi relatado que a ativação farmacológica do autorreceptor 5ht1b na rafe dorsal aumenta a atividade do SERT demonstrando a modulação deste receptor sobre a atividade do transportador (HAGAN *et al.*, 2012). Portanto, não é possível descartar completamente uma influência da maior expressão do 5ht1b no hipotálamo sobre a atividade do SERT mesmo que a sua expressão gênica não tenha sido diferente entre os grupos.

Foi proposto que a ativação do 5ht1b no hipotálamo envolve a hiperpolarização dos neurônios que sintetizam os neuropeptídeos orexígenos NPY e AgRP com a consequente inibição da liberação desses neuropeptídeos levando à diminuição da ingestão alimentar (HEISLER *et al.*, 2006). Assim, seria esperado que

a ação da fluoxetina resultasse em maior inibição da ingestão considerando a maior expressão do 5ht1b no grupo separado. A ausência de alterações comparado ao grupo controle enfatiza a função do 5ht1b como um autorreceptor. Junto ao 5ht1a, o 5ht1b tem sido descrito como um autorreceptor, com o 5ht1a agindo no corpo celular e o 5ht1b no terminal nervoso (HAGAN *et al.*, 2012). Portanto, a maior expressão do autorreceptor 5ht1b poderia modular a ação do SERT aumentando-a (HAGAN *et al.*, 2012) e inibindo a ação da fluoxetina.

Os níveis cerebrais de serotonina não foram determinados neste estudo, no entanto foi demonstrado que a separação materna aumenta os níveis cerebrais de serotonina em fêmeas (ARBORELIUS e EKLUND, 2007). Esta monoamina tem sido descrita como fundamental à ativação do eixo HPA (HEISLER *et al.*, 2007), responsável por mediar a resposta ao estresse (SMITH e VALE, 2006). Essa ativação ocorre via 5ht2c (HEISLER *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que os efeitos do estresse causado pela separação materna sobre o comportamento emocional são mediadas pela ação serotoninérgica via receptor 5ht2c durante a separação materna (SARKAR *et al.*, 2014). Assim, embora neste estudo não tenha sido demonstrada nenhuma alteração na expressão gênica nas fêmeas na vida adulta, uma possível ação desse receptor durante a separação materna modulando os efeitos do estresse no início da vida sobre o comportamento alimentar em longo prazo não pode ser descartada.

Em resumo, o presente experimento demonstrou que a separação materna durante a lactação afeta o comportamento alimentar em fêmeas de forma tardia, na vida adulta. Esses efeitos sobre o consumo alimentar podem ser observados apenas numa idade mais avançada. Precisamente, aos 365 dias de vida quando comparado aos 35 dias. A nível molecular, o estresse por separação promove aumento da expressão do receptor serotoninérgico *5ht1b*, mas não do *5ht2c* ou do *Sert* no hipotálamo de animais adultos. Juntos, esses achados associam os efeitos da exposição ao estresse no início da vida sobre o comportamento alimentar em longo prazo ao aumento da expressão do receptor serotoninérgico *5ht1b*, sugerindo que o sistema serotoninérgico medeia as alterações da separação materna sobre o comportamento alimentar.

Experimento 3: Efeito da separação materna sobre o comportamento alimentar hedônico e sistema dopaminérgico

A discussão do experimento 3 encontra-se descrita no apêndice 1 no final desta tese em forma de artigo publicado na revista *Appetite* (ISSN: 0195-6663), volume 123, sob o título “Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males”.

7 CONCLUSÃO

A Separação materna neonatal promove ajustes de mecanismos do controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar na vida adulta de ratos, envolvendo os sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e dopaminérgico.

REFERÊNCIAS

ALMAZAN, G. Ontogeny of hypothalamic vasopressin, oxytocin and somatostatin gene expression. **Developmental Brain Research**, v. 45, n. 1, 1989.

ANDREWS, Z. B.; ABIZAID, A. Neuroendocrine mechanisms that connect feeding behavior and stress. **Front Neurosci**, v. 8, p. 312, 2014. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324716> >.

ARBORELIUS, L.; EKLUND, M. B. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. **Neuroscience**, v. 145, n. 2, p. 738-50, Mar 16 2007. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222517> >.

BAGDADE, J. The Significance of Basal Insulin Levels in the Evaluation of the Insulin Response to Glucose in Diabetic and Nondiabetic **The Journal of Clinical Investigation**, v. 46, n. 10, p. 15-49-1557, 1967.

BARAM T, S. P. L. Ontogeny of corticotropin releasing hormone gene expression in rat hypothalamus — comparison with somatostatin. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 473-478, 1991.

BARNA, I. et al. Gender-specific effect of maternal deprivation on anxiety and corticotropin-releasing hormone mRNA expression in rats. **Brain Res Bull**, v. 62, n. 2, p. 85-91, Dec 15 2003. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638381> >.

BATTERHAM, R. L.; BLOOM, S. R. The gut hormone peptide YY regulates appetite. **Ann N Y Acad Sci**, v. 994, p. 162-8, Jun 2003. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851312> >.

BAUM, A.; FLEMING, R.; REDDY, D. M. Unemployment stress: loss of control, reactance and learned helplessness. **Soc Sci Med**, v. 22, n. 5, p. 509-16, 1986. ISSN 0277-9536 (Print) 0277-9536 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3704688> >.

BELLISLE, F. et al. Sweetness, satiation, and satiety. **J Nutr**, v. 142, n. 6, p. 1149S-54S, Jun 2012. ISSN 1541-6100 (Electronic) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573779> >.

A BÍBLIA. Provérbios. Tradução de João Ferreira de Almeida. Rio de Janeiro: King Cross Publicações, 2008. 1110p. Velho Testamento e Novo Testamento.

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> >.

BROBERGER, C. Neuropeptide Y Innervation and Neuropeptide-Y-Y1-Receptor-Expressing Neurons in the Paraventricular Hypothalamic Nucleus of the Mouse. **Neuroendocrinology**, v. 70, n. 5, p. 295-305, 1999.

CHAMPAGNE, F.; MEANEY, M. J. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. **Prog Brain Res**, v. 133, p. 287-302, 2001. ISSN 0079-6123 (Print) 0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11589138> >.

CHANG, L. L.; ALFRED WUN, W. S.; WANG, P. S. Effects and mechanisms of nonylphenol on corticosterone release in rat zona fasciculata-reticularis cells. **Toxicol Sci**, v. 118, n. 2, p. 411-9, Dec 2010. ISSN 1096-0929 (Electronic) 1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837582> >.

CHROUSOS, G. P. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24 Suppl 2, p. S50-5, Jun 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997609> >.

CIFANI, C. et al. A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine, fluoxetine, topiramate, and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 204, n. 1, p. 113-25, May 2009. ISSN 1432-2072 (Electronic) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125237> >.

CLARK, J. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. **Endocrinology** v. 115, n. 1, p. 427-429, 1984.

COLL, A. P. et al. The effects of proopiomelanocortin deficiency on murine adrenal development and responsiveness to adrenocorticotropin. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4721-7, Oct 2004. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231703> >.

CONKLIN, A. I. et al. Social relationships and healthful dietary behaviour: evidence from over-50s in the EPIC cohort, UK. **Soc Sci Med**, v. 100, p. 167-75, Jan 2014. ISSN 1873-5347 (Electronic) 0277-9536 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035440> >.

CONSIDINE, R. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 292-295, 1996.

COWLEY, M. Integration of NPY, AGRP, and Melanocortin Signals in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus: Evidence of a Cellular Basis for the Adipostat. **Neuron** v. 24, n. 1, p. 155-163, 1999.

D'ARGENIO, A. et al. Early trauma and adult obesity: is psychological dysfunction the mediating mechanism? **Physiol Behav**, v. 98, n. 5, p. 543-6, Dec 07 2009. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733190> >.

DA SILVA, M. C. et al. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. **J Dev Orig Health Dis**, v. 5, n. 3, p. 219-28, Jun 2014. ISSN 2040-1752 (Electronic) 2040-1744 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24901662> >.

DANIELS, W. M. et al. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 1-2, p. 3-14, Jun 2004. ISSN 0885-7490 (Print) 0885-7490 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15214501> >.

DENTAB, G. The ontogeny of the neuroendocrine response to endotoxin. **Developmental Brain Research**, v. 117, n. 1, p. 21-29, 1999.

DUPOUY, J. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. **Journal of Endocrinology**, v. 65, p. 347-352, 1975.

EILAND, L. Pain and Stress: Potential Impact on the Developing Brain. In: PERLMAN, J. (Ed.). **Neurology: Neonatology Questions and Controversies (Second Edition)**: Elsevier Health Sciences, 2012. cap. 13, p.219-236.

ELIAS, C. Leptin Activates Hypothalamic CART Neurons Projecting to the Spinal Cord. **Neuron**, v. 21, n. 6, p. 1375-1385, 1998.

FERNSTROM, J. D.; WURTMAN, R. J. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. **Science**, v. 178, n. 4059, p. 414-6, Oct 27 1972. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5077329> >.

FORDE, C. Influence of meal texture on eating rate and food intake. Results from three ad-libitum trials. **Appetite**, v. 71, p. 474, 2013.

GAHAGAN, S. Development of eating behavior: biology and context. **J Dev Behav Pediatr**, v. 33, n. 3, p. 261-71, Apr 2012. ISSN 1536-7312 (Electronic) 0196-206X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472944> >.

GAO, H. R. et al. Corticotropin releasing factor excites neurons of posterior hypothalamic nucleus to produce tachycardia in rats. **Sci Rep**, v. 6, p. 20206, Feb 01 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26831220> >.

GONDRÉ-LEWIS, M. C. et al. Early life stress is a risk factor for excessive alcohol drinking and impulsivity in adults and is mediated via a CRF/GABA mechanism. **Stress**, v. 19, n. 2, p. 235-247, 2016. ISSN 1025-3890 1607-8888.

GONZALEZ, R.; TIWARI, A.; UNNIAPPAN, S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 381, n. 4, p. 643-8, Apr 17 2009. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19248766> >.

GRANADO, M. et al. Leptin in early life: a key factor for the development of the adult metabolic profile. **Obes Facts**, v. 5, n. 1, p. 138-50, 2012. ISSN 1662-4033 (Electronic) 1662-4025 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22433625> >.

GREEN, B. G.; NACHTIGAL, D. Temperature Affects Human Sweet Taste via At Least Two Mechanisms. **Chem Senses**, v. 40, n. 6, p. 391-9, Jul 2015. ISSN 1464-3553 (Electronic) 0379-864X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963040> >.

GRIMM, E. R.; STEINLE, N. I. Genetics of eating behavior: established and emerging concepts. **Nutr Rev**, v. 69, n. 1, p. 52-60, Jan 2011. ISSN 1753-4887 (Electronic) 0029-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198635> >.

GRINO M, S. Y. W. Ontogeny of Expression of the Corticotropin-Releasing Factor Gene in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and of the Proopiomelanocortin Gene in Rat Pituitary. **Endocrinology**, v. 124, n. 1, p. 60-68, 1989.

HAGAN, C. E. et al. 5-HT(1B) autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. **Synapse**, v. 66, n. 12, p. 1024-34, Dec 2012. ISSN 1098-2396 (Electronic) 0887-4476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22961814> >.

HAHN, T. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nature Neuroscience**, v. 1, p. 271-272, 1998.

HALFORD, J. C.; WANNINAYAKE, S. C.; BLUNDELL, J. E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 61, n. 2, p. 159-68, Oct 1998. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738531> >.

HANCOCK, S.; GRANT, V. Early maternal separation increases symptoms of activity-based anorexia in male and female rats. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 35, n. 3, p. 394-406, Jul 2009. ISSN 0097-7403 (Print) 0097-7403 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594284> >.

HAUGEN, A. C. et al. Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. **J Dev Orig Health Dis**, v. 6, n. 2, p. 55-64, Apr 2015. ISSN 2040-1752 (Electronic) 2040-1744 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471238> >.

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. et al. Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. **J Neurosci**, v. 27, n. 26, p. 6956-64, Jun 27 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596444> >.

HERMAN, J. P. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 292-298, 2012.

HILL, R. A. et al. Long-term effects of combined neonatal and adolescent stress on brain-derived neurotrophic factor and dopamine receptor expression in the rat forebrain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 11, p. 2126-35, Nov 2014. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25159716> >.

HILL, R. A. et al. Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a "two hit" rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. **Hippocampus**, v. 24, n. 10, p. 1197-211, Oct 2014. ISSN 1098-1063 (Electronic) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24802968> >.

HOLUBOVA, A. et al. Effects of perinatal stress and drug abuse on maternal behavior and sensorimotor development of affected progeny. **Physiol Res**, v. 66, n. Supplementum 4, p. S481-S491, Dec 30 2017. ISSN 1802-9973 (Electronic) 0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29355375> >.

HUO, L. et al. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2189-97, May 2007. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17317774> >.

HUOT, R. L. et al. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Res**, v. 950, n. 1-2, p. 52-63, Sep 20 2002. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231228> >.

IRVING, D. A. F. M. K. M.-F. L. M. The relationship between childhood sexual abuse and subsequent onset of bulimia nervosa **Child Abuse & Neglect**, v. 17, p. 305-314, 1993.

IWASAKI, S. et al. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. **Physiol Behav**, v. 70, n. 5, p. 551-6, Sep 15 2000. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11111010> >.

JONES, K. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 2, p. 266-271, 2011.

KALINICHEV, M. et al. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, n. 1, p. 131-40, Aug 2002. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076732> >.

KALRA, S. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 10931-10935, 1991.

KELLER-WOOD, M. Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control. **Compr Physiol**, v. 5, n. 3, p. 1161-82, Jul 1 2015. ISSN 2040-4603 (Electronic) 040-4603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140713> >.

KELLER-WOOD, M. E.; DALLMAN, M. F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocr Rev**, v. 5, n. 1, p. 1-24, Winter 1984. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6323158> >.

KING, A. Neurobiology: Rise of resilience. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. S18-9, Mar 03 2016. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26934522> >.

KOCH, F. S.; SEPA, A.; LUDVIGSSON, J. Psychological stress and obesity. **J Pediatr**, v. 153, n. 6, p. 839-44, Dec 2008. ISSN 1097-6833 (Electronic) 022-3476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657829> >.

KONDOH, K. et al. A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 103-6, Apr 07 2016. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27001694> >.

KORIM, W. S.; LLEWELLYN-SMITH, I. J.; VERBERNE, A. J. Activation of Medulla-Projecting Perifornical Neurons Modulates the Adrenal Sympathetic Response to Hypoglycemia: Involvement of Orexin Type 2 (OX2-R) Receptors. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 810-9, Feb 2016. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26653571> >.

LA FLEUR, S. E. et al. Choice of lard, but not total lard calories, damps adrenocorticotropin responses to restraint. **Endocrinology**, v. 146, n. 5, p. 2193-9, May 2005. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705773> >.

LAU, J.; HERZOG, H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. **Front Neurosci**, v. 8, p. 313, 2014. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352770> >.

LAURENT, F. Expression of the oxytocin and vasopressin genes in the rat hypothalamus during development: an in situ hybridization study. **Developmental Brain Research**, v. 46, n. 1, 1989.

LEHMANN, J. et al. Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. **Neurobiol Aging**, v. 23, n. 3, p. 457-66, May-Jun 2002. ISSN 0197-4580 (Print) 0197-4580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959408> >.

LEONHARDT, U. Immunoreactive leptin and leptin mRNA expression are increased in rat hypo- but not hyperthyroidism. **Journal of Endocrinology**, v. 163, n. 1, p. 115-121, 1999.

LESSE, A. Chronic Postnatal Stress Induces Depressive-like Behavior in Male Mice and Programs second. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 6, p. 4813-4819, 2016.

LEVINE, S. The Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis The Influence of Maternal Factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, n. 275, p. 88-93, 1994.

LEVINE, S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. **Neurotox Res**, v. 4, n. 5-6, p. 557-564, Aug-Sep 2002. ISSN 1476-3524 (Electronic) 1029-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12754166> >.

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> >.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659-62, Sep 12 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287218> >.

LLABRE, M. M.; HADI, F. War-related exposure and psychological distress as predictors of health and sleep: a longitudinal study of Kuwaiti children. **Psychosom Med**, v. 71, n. 7, p. 776-83, Sep 2009. ISSN 1534-7796 (Electronic) 0033-3174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592513> >.

LUNDBERG, S. et al. Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. **Horm Behav**, v. 87, p. 137-144, Jan 2017. ISSN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884596> >.

LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 434-45, Jun 2009. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401723> >.

LYONS, P. M.; TRUSWELL, A. S. Serotonin precursor influenced by type of carbohydrate meal in healthy adults. **Am J Clin Nutr**, v. 47, n. 3, p. 433-9, Mar 1988. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3279747> >.

MACRI, S.; MASON, G. J.; WURBEL, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 4, p. 1017-24, Aug 2004. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305870> >.

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

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 5, p. 717-28, Jun 2010. ISSN 1873-3360 (Electronic) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939573> >.

MARZOUK, H. F. et al. Suramin prevents ACTH-stimulated corticosterone release by dispersed adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 666-8, Jan 1990. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2152879> >.

MCEWEN, E. R. D. K. A. B. S. A putative glucocorticoid receptor and a transcortin-like macromolecule in pituitary cytosol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 421, p. 115-123, 1976.

MCINTOSH, J.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 113, n. 1-2, p. 97-106, Mar 12 1999. ISSN 0165-3806 (Print) 0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064879> >.

MELO, A. Maternal and littermate deprivation disrupts maternal behavior and social-learning of food preference in adulthood: tactile stimulation, nest odor, and social rearing prevent these effects. **Developmental Psychobiology**, v. 48, n. 3, p. 209-219, 2006.

MICHAELS, C. Neonatal stress and litter composition alter sucrose intake in both rat dam and offspring. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 5, p. 735-741, 2006.

MICHAELS, C. C.; HOLTZMAN, S. G. Enhanced sensitivity to naltrexone-induced drinking suppression of fluid intake and sucrose consumption in maternally separated rats.

Pharmacol Biochem Behav, v. 86, n. 4, p. 784-96, Apr 2007. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459462> >.

MILLER, G. E.; CHEN, E.; PARKER, K. J. Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging: moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. **Psychol Bull**, v. 137, n. 6, p. 959-97, Nov 2011. ISSN 1939-1455 (Electronic) 0033-2909 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787044> >.

MIRMOHAMMADSADEGHI, Z. et al. Role of paraventricular hypothalamic dopaminergic D1 receptors in food intake regulation of food-deprived rats. **Eur J Pharmacol**, v. 818, p. 43-49, Jan 5 2018. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29056523> >.

MOELLER, F. G. et al. Psychiatric aspects of impulsivity. **Am J Psychiatry**, v. 158, n. 11, p. 1783-93, Nov 2001. ISSN 0002-953X (Print) 0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691682> >.

MOENS, E. et al. Unfavourable family characteristics and their associations with childhood obesity: a cross-sectional study. **Eur Eat Disord Rev**, v. 17, n. 4, p. 315-23, Jul 2009. ISSN 1099-0968 (Electronic) 1072-4133 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19452495> >.

MOURA, E. Regulação do comportamento alimentar. In: SAWAYA, A. (Ed.). **Fisiologia da Nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento**. 1. São Paulo: Atheneu, 2013. cap. 5, p.95-112.

MULLER, A. F. et al. Ghrelin drives GH secretion during fasting in man. **Eur J Endocrinol**, v. 146, n. 2, p. 203-7, Feb 2002. ISSN 0804-4643 (Print) 0804-4643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834429> >.

MUROVETS, V. O. et al. [Involvement of Tas1r3 receptor protein in control of the metabolism of glucose at different levels of glycemia in mice]. **Zh Evol Biokhim Fiziol**, v. 50, n. 4, p. 296-304, Jul-Aug 2014. ISSN 0044-4529 (Print) 0044-4529 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775865> >.

NECTOW, A. R. et al. Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. **Cell**, v. 170, n. 3, p. 429-442 e11, Jul 27 2017. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28753423> >.

NONOGAKI, K.; OHASHI-NOZUE, K.; OKA, Y. A negative feedback system between brain serotonin systems and plasma active ghrelin levels in mice. **Biochem Biophys Res Commun**,

v. 341, n. 3, p. 703-7, Mar 17 2006. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430857> >.

OKUMURA, T. Cocaine-Amphetamine-Regulated Transcript (CART) Acts in the Central Nervous System to Inhibit Gastric Acid Secretion via Brain Corticotropin-Releasing Factor System 1. **Endocrinology**, v. 141, n. 8, p. 2854-2860, 2000.

ORTOLANI, D. et al. Stress-induced endocrine response and anxiety: the effects of comfort food in rats. **Stress**, v. 17, n. 3, p. 211-218, 2014. ISSN 1025-3890 1607-8888.

PARKS, E. P. et al. Influence of stress in parents on child obesity and related behaviors. **Pediatrics**, v. 130, n. 5, p. e1096-104, Nov 2012. ISSN 1098-4275 (Electronic) 0031-4005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090343> >.

PECORARO, N. et al. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3754-62, Aug 2004. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142987> >.

PECORARO, N. et al. Chronic Stress Promotes Palatable Feeding, which Reduces Signs of Stress: Feedforward and Feedback Effects of Chronic Stress. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3754-3762, 2004. ISSN 0013-7227 1945-7170.

PENKE, Z. Neonatal maternal deprivation modifies feeding in response to pharmacological and behavioural factors in adult rats. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 421-427, 2002.

PENKE, Z. et al. Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behaviour in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 14, n. 4, p. 747-55, Aug 2001. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556899> >.

PINTAR, J. Proopiomelanocortin Gene Expression, Prohormone Processing, and Secretion during Rat Pituitary Development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 512, p. 318-327, 1987.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 18, n. 3, p. 195-200, May 1993. ISSN 0169-328X (Print) 0169-328X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497182> >.

PRADHAN, G.; SAMSON, S. L.; SUN, Y. Ghrelin: much more than a hunger hormone. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 16, n. 6, p. 619-24, Nov 2013. ISSN 1473-6519 (Electronic) 1363-1950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100676> >.

PRICE, P. et al. Adrenitis and the adrenocortical response of resistant and susceptible mice to acute murine cytomegalovirus infection. **Eur J Clin Invest**, v. 26, n. 9, p. 811-9, Sep 1996. ISSN 0014-2972 (Print) 0014-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8889445> >.

REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505-11, Dec 1985. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2998738> >.

RODGERS, R. J.; HOLCH, P.; TALLETT, A. J. Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 97, n. 1, p. 3-14, Nov 2010. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214921> >.

RYU, V. et al. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. **Brain Res**, v. 1295, p. 127-34, Oct 27 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666012> >.

SAILER, U.; TRISCOLI, C.; CROY, I. Still Eating Despite Decreased Olfactory Pleasure-The Influence of Odor Liking and Wanting on Food Intake. **Chem Senses**, v. 41, n. 6, p. 497-504, Jul 2016. ISSN 1464-3553 (Electronic) 0379-864X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976121> >.

SALVY, S. J. et al. Effects of social contexts on overweight and normal-weight children's food intake. **Physiol Behav**, v. 92, n. 5, p. 840-6, Dec 5 2007. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628616> >.

SALVY, S. J. et al. Influence of parents and friends on children's and adolescents' food intake and food selection. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 1, p. 87-92, Jan 2011. ISSN 1938-3207 (Electronic) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048059> >.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Res**, v.

396, n. 1, p. 64-76, Mar 1986. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3011218> >.

SARKAR, A.; CHACHRA, P.; VAIDYA, V. A. Postnatal fluoxetine-evoked anxiety is prevented by concomitant 5-HT_{2A/C} receptor blockade and mimicked by postnatal 5-HT_{2A/C} receptor stimulation. **Biol Psychiatry**, v. 76, n. 11, p. 858-68, Dec 1 2014. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315410> >.

SCHMIDT, M. V. et al. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. **J Neuroendocrinol**, v. 18, n. 11, p. 865-74, Nov 2006. ISSN 0953-8194 (Print) 0953-8194 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17026536> >.

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> >.

SCLAFANI, A. Oral, post-oral and genetic interactions in sweet appetite. **Physiol Behav**, v. 89, n. 4, p. 525-30, Nov 30 2006. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647093> >.

SHANKS, N. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activation Following Endotoxin Administration in the Developing Rat: A CRH-Mediated Effect. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, n. 4, p. 375-383, 1994.

SHRESTHA, Y. B.; WICKWIRE, K.; GIRAUDO, S. Q. Role of AgRP on Ghrelin-induced feeding in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Regul Pept**, v. 133, n. 1-3, p. 68-73, Jan 15 2006. ISSN 0167-0115 (Print) 0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226323> >.

SILJEE, J. E. et al. Melanocortin 4 receptor distribution in the human hypothalamus. **Eur J Endocrinol**, v. 168, n. 3, p. 361-9, Mar 2013. ISSN 1479-683X (Electronic) 0804-4643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211571> >.

SIPERSTEIN, E. et al. Cytological changes in the rat anterior pituitary from birth to maturity. **Anat Rec**, v. 118, n. 3, p. 593-619, Mar 1954. ISSN 0003-276X (Print) 003-276X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13158871> >.

SMALL, C. J. et al. Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 27, n. 4, p. 530-3, Apr 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12664087> >.

SMITH, C. L.; HAMMOND, G. L. Ontogeny of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the rat. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 983-8, Feb 1991. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1989877> >.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 8, n. 4, p. 383-95, 2006. ISSN 1294-8322 (Print) 1294-8322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290797> >.

SOHN, J. Network of hypothalamic neurons that control appetite. **BMB Reports**, v. 48, n. 4, p. 229-233, 2015.

SOUSA, V. C. et al. Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 7, p. 1680-5, Jul 2014. ISSN 1558-1497 (Electronic) 0197-4580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24559649> >.

STANLEY, S. A. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats **Brain Research**, v. 893, n. 1-2, p. 186-194, 2001.

TAKEUCHI, T. et al. Perinatal changes in amylase and serum corticosterone levels in rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 497, n. 3, p. 657-62, May 26 1977. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/889881> >.

TANG, F.; PHILLIPS, J. G. Pituitary-adrenal response to ether stress in the neonatal rat. **J Endocrinol**, v. 75, n. 1, p. 183-4, Oct 1977. ISSN 0022-0795 (Print) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/200694> >.

TEJAS-JUAREZ, J. G. et al. Stimulation of dopamine D4 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces hyperphagia: involvement of glutamate. **Physiol Behav**, v. 133, p. 272-81, Jun 22 2014. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24805978> >.

THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B.; PLOTSKY, P. M. Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. **Brain Res**, v. 870, n. 1-2, p. 87-101, Jul 07 2000. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869505> >.

TIMPL, P. et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. **Nat Genet**, v. 19, n. 2, p. 162-6, Jun 1998. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620773> >.

TSUDA, M. Long-Lasting Consequences of Neonatal Maternal Separation on Social Behaviors in Ovariectomized Female Mice. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. 1-11, 2012.

UGRUMOV, M. Developing Hypothalamus in Differentiation of Neurosecretory Neurons and in Establishment of Pathways for Neurohormone Transport. **International Review of Cytology**, v. 129, p. 207-267, 1991.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun 2009. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19469025> >.

UMEHARA, H. et al. Calcium Signaling Pathway Is Associated with the Long-Term Clinical Response to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI) and SSRI with Antipsychotics in Patients with Obsessive-Compulsive Disorder. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157232, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281126> >.

VALE, W. et al. Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. **Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 1121-31, Sep 1983. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6307665> >.

VARGA, J. Comparison of Stress-Induced Changes in Adults and Pups: Is Aldosterone the Main Adrenocortical Stress Hormone during the Perinatal Period in Rats. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-11, 2013.

VELAZQUEZ-SANCHEZ, C. et al. High trait impulsivity predicts food addiction-like behavior in the rat. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 10, p. 2463-72, Sep 2014. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776685> >.

WALF, A. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocol**, v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WALKER, C. D. et al. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 118, n. 4, p. 1445-51, Apr 1986. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3004915> >.

WEISER, M. Inhibitory effects of corticosterone in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on stress-induced ACTH secretion and gene expression in the PVN and anterior pituitary. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 23, n. 12, p. 1231-1240, 2011.

WHITNALL, M. Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. **Nature**, v. 317, p. 248-250, 1985.

WIRTH, M. Paraventricular hypothalamic α -melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. **Peptides**, v. 22, n. 1, p. 129-134, 2001.

WONG, R. W. F. A. D. T. Fluoxetine: A Serotonergic Appetite Supressant Drug. **Drug Development Research**, v. 17, p. 1-15, 1989.

XING, Y. et al. Development of adrenal cortex zonation. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 44, n. 2, p. 243-74, Jun 2015. ISSN 1558-4410 (Electronic) 0889-8529 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038200> >.

XU, H. et al. The effect of different maternal deprivation paradigms on the expression of hippocampal glucocorticoid receptors, calretinin and calbindin-D28k in male and female adolescent rats. **Neurochem Int**, v. 59, n. 6, p. 847-52, Nov 2011. ISSN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835217> >.

YASWEN, L. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. **Nature Medicine**, v. 5, n. 9, p. 1066-1070, 1999.

YAU, Y. H.; POTENZA, M. N. Stress and eating behaviors. **Minerva Endocrinol**, v. 38, n. 3, p. 255-67, Sep 2013. ISSN 0391-1977 (Print) 0391-1977 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126546> >.

YILMAZ, M.; MEISTER, M. Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli. **Curr Biol**, v. 23, n. 20, p. 2011-5, Oct 21 2013. ISSN 1879-0445 (Electronic) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120636> >.

YOO, S. B. et al. The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal

separation. **Neuropeptides**, v. 45, n. 5, p. 343-9, Oct 2011. ISSN 1532-2785 (Electronic) 0143-4179 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821286> >.

YOUNG, S. L. L. A. W. S. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. **Journal of Physiology**, v. 403, p. 511-523, 1988.

YOUNG, S. N. How to increase serotonin in the human brain without drugs. **J Psychiatry Neurosci**, v. 32, n. 6, p. 394-399, 2007.

ZHU, X.; GLEIBERMAN, A. S.; ROSENFELD, M. G. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. **Physiol Rev**, v. 87, n. 3, p. 933-63, Jul 2007. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615393> >.

ZIMMERBERG, B.; SAGESER, K. A. Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior. **Front Psychiatry**, v. 2, p. 39, 2011. ISSN 1664-0640 (Electronic) 1664-0640 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747771> >.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo referente ao experimento 3 publicado na Appetite (ISSN: 0195-6663).



Contents lists available at ScienceDirect

Appetite

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

Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males

Julliet Araújo de Souza ^{a,*}, Matilde Cesiana da Silva ^b, Rhowena Jane Barbosa de Matos ^b, Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida ^c, Luana Cruz Beltrão ^a, Felipe Leitão de Souza ^c, Raul Manhães de Castro ^a, Sandra Lopes de Souza ^c

^a Federal University of Pernambuco, Department of Nutrition, Brazil

^b Federal University of Pernambuco, Academic Center of Vitória de Santo Antão, Brazil

^c Federal University of Pernambuco, Department of Anatomy, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2017

Received in revised form

1 December 2017

Accepted 3 December 2017

Available online 8 December 2017

ABSTRACT

Maternal separation stress (MS) is a model of early life stress performed by the separation between dam and pups in the first days of life. This model has been associated with eating behavior and dopaminergic system abnormal phenotypes. This study aims to investigate whether maternal separation in the light or dark phase of the circadian cycle promotes phenotypic adjustments in the eating behavior and the dopamine system in both males and females. Lactating Wistar rats were separated from their litters from postnatal day 1 (PND 1) to PND 14 for 6 h in the light or dark phase of the circadian cycle. The groups of female control (FC), male control (MC), female rat separated in the dark (FSD), male rat separated in the dark (MSD), female rat separated in the light (FSL), and male rat separated in the light (MSL) were composed. The assessment of food intake was performed at the age of 120–150 days and the analysis of brainstem drd1a and drd2a dopamine receptors expression at 180 days of life. Maternal separation promoted higher palatable diet intake independent on sex and circadian cycle. On the other hand, drd1a and drd2a dopamine receptors expression were higher only in males separated in the dark phase of the circadian cycle. These findings demonstrate that maternal separation effects on feeding behavior do not depend on sex and circadian cycle, but the effects on dopamine receptors expression depend on sex and circadian cycle.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Exposure to early life stress has been associated with behavioral disorders in adult life, such as depression and anxiety. Children from families exposed to high levels of stress are more likely to be obese as compared to those from normal families (Koch, Sepa, & Ludvigsson, 2008; Moens, Braet, Bosmans, & Rosseel, 2009; Parks et al., 2012). Another type of stress factor, childhood sexual abuse, is a risk factor for the development of obesity and bulimia nervosa in adult life (Koch et al., 2008; Müller et al., 1993; D'Argenio et al., 2009). The loss of mother or a close relative in the early life of a child increases his risk of obesity in adulthood (Koch et al., 2008;

D'Argenio et al., 2009). Finally, exposure to wartime conditions during childhood has been associated with a high body mass index (Llabre & Hadi, 2009). In rodents, maternal separation has been used as a model to study the effect of early life stress. In separated animals, an increase in the consumption of palatable diet (Maniam & Morris, 2010), greater preference for sucrose solution (Michaels & Holtzman, 2007), rebound hyperphagia (Ryu, Yoo, Kang, Lee, & Jahng, 2009) and anticipated satiety (da Silva et al., 2014) has been observed. These findings indicate that the early life environment plays a critical role in establishing circuits that regulate stress and eating behavior and influences the interaction between them. Among these circuits is included the dopaminergic system.

In separated animals, Drd1 dopamine receptor has been shown to facilitate the antidepressant effects of selegine, and the Drd2 receptor mediates its anti-anhedonic effects (Amiri et al., 2016).

* Corresponding author.

E-mail address: julliet.jesus@gmail.com (J.A. de Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.12.004>

0195-6663/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Maternal separation was associated with impairment of dopamine transporter activity in spontaneously hypertensive rats (Womersley, Hsieh, Kellaway, Gerhardt, & Russell, 2011). Furthermore, a short period of maternal separation increased the expression of *Drd1* in the hippocampus and *Drd2* in the ventral tegmental area and periaqueductal gray 7 weeks later (Ploj, Roman, & Nylander, 2003). These findings demonstrate that maternal separation is capable of altering the long-term functioning of the dopaminergic system.

Although it has been shown that maternal separation affects the feeding behavior and dopaminergic system, the knowledge about the relationship between these factors is limited. Rats are nocturnal animals; therefore, they naturally forage nocturnally and spend more time caring for their offspring in the light phase. (Jensen Pena & Champagne, 2013). In the present study, the animals were separated from their mothers in the light or dark phase of the light/dark cycle. Additionally, the effects of maternal separation have been reported to be distinct, depending on the sex (da Silva et al., 2014). However, most studies continue to investigate males more than females. Thus, in the present study, we investigated whether maternal separation in the phase of greater pups-directed maternal behavior (light phase) or in the dark phase promotes phenotypic adjustments in the eating behavior and the dopamine system in both males and females.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats ($n = 40$) were collected from the colony of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco. After confirming pregnancy, the pregnant rats were individually housed in polypropylene cages in a facility with standard conditions of temperature (20°C), luminosity (12/12 h inverted light/dark cycle with lights on at 06:00 p.m.), and free access to water and diet (Labina/Purina Brazil). Animal management and care followed the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) with the approval of the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (Protocol 23076.022943/2008-71).

To obtain the litters, the pups of both sexes from several mothers were randomized on the first postnatal day (PND1), producing litters of eight animals per cage. Maternal separation procedures were performed during the lactation period. After weaning, on the 25th postnatal day, two puppies (of same sex) were conditioned in each cage until they reached adulthood, after which different tests were performed to study their feeding behavior.

2.2. Maternal separation and experimental groups

The experimental groups were delineated according to the incidence of stress and the phase of the light/dark cycle in which maternal separation was performed. Male and female animals that constituted the control group remained with the dams throughout the lactation period. The separated animals (4:4 ratio of males and females/litter) were removed from the nest for 6 h from PND1 to PND14 and then maintained in incubators at temperatures of $30\text{--}32^{\circ}\text{C}$, according to the protocol of Plotsky and Meaney (1993). The separation was performed in two phases of the light/dark cycle: one group was separated for 6 h in the light phase (06:00 p.m. to 06:00 a.m.) and the other in the dark phase (06:00 a.m. to 06:00 p.m.). The groups of female control (FC), male control (MC), female rat separated in the dark (FSD), male rat separated in the dark (MSD), female rat separated in the light (FSL), and male rat separated in the light (MSL) were composed of male rats ($n = 10$) and

female rats ($n = 10$). After the 14th day of life, the animals remained with their dams in transparent cages (dimensions: $45.5 \times 40.0 \times 21$ cm) without any additional manipulation until weaning.

2.3. Palatable diet intake

At the age of 120–150 days, the rats from the control and maternal separation groups were housed in individual cages for adaptation to isolation for 10 days. Soon after this period, 30 g of palatable diet (52% lipids and 33% carbohydrate) were offered to the rats in their cages. The amount of food ingested (g) was considered as the difference between the amount of food offered and that rejected within 1 h. The diet composition used is expressed in Table 1.

2.4. Brainstem *drd1a* and *drd2a* dopamine receptors expression

At 180 days of life, the animals were decapitated at 08:00 a.m. Their skulls were immediately dissected, and the brainstems were rapidly frozen on dry ice and stored at -80°C for analysis of gene expression by RT-PCR. The RT-PCR method consists of three steps: 1) total RNA extraction; 2) conversion of RNA into cDNA, and 3) amplification of polymerase chain reaction. Total RNA was extracted using 1 mL of Trizol reagent (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA) with a homogenizer (Pellet Plastle with Cordless Motor; Fisher Scientific, USA). Total RNA was isolated following the protocol suggested by the manufacturer (Invitrogen[®]) and, subsequently, the amount and quality of the purified RNA was evaluated by the NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific; USA). Then, the RNA samples were treated with the Wipeout gDNA Solution (Qiagen[®]; Hilden, Germany) to effectively remove the genomic DNA contamination for 2 min at 42°C and stored on ice. Subsequently, reverse transcription of 2 μg of purified RNA into cDNA was performed by using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen[®]) at 42°C for 15 min. The enzyme was inactivated at 95°C for 3 min. The cDNA preparation was then stored at -20°C until use. Subsequently, 5 mL of each of the diluted cDNA sample was used as a template for real-time PCR amplification by using SYBR Green (Qiagen[®]) as an intercalating fluorophore. The real-time PCR detection system used was the Rotor Gene HRM-2Plex

Table 1
Composition of the experimental diet.

Composition	Amount (g/100 g)
Corn starch	12.7
Wheat flour	15.0
Maisena biscuit	7.2
Soy flour	10.0
Casein	19.6
Cellulose	1.2
Guar gum	0.5
Soy oil	6.0 ml
Lard	4.0
Margarine	4.2
Sugar	17.0
Minerals	15.0
Vitamins	0.5
Coline	0.2
Methionine	0.2
BHT	0.14 mg
Macronutrients (energy %)	
Protein	15
Carbohydrate	33
Lipids	52
Kcal	411

(Qiagen®). The PCR parameters used included, i) the first step of initial denaturation for 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 5 s at 95 °C, and 10 s at 60 °C. The oligonucleotides or “primers” used for the amplification are shown in Table 2. The cycle threshold values (CT) of the samples were determined by normalization from the fluorescence curves versus the number of cycles of PCR during exponential amplification. The standard curves for all primer amplifications (or oligonucleotides) were generated by plotting the mean CT values as a function of the logarithm of the number of target template molecules. All quantifications were normalized to the reference (or house-keeping) gene: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The relative quantification value of each target gene was analyzed by a comparative CT method. The following formula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was used to calculate the relative amount of the transcript in the sample, which was then normalized with the endogenous reference.

Where, ΔCT is the difference between the CT of the gene of interest and the GAPDH, and $\Delta\Delta CT$ for the sample is equal to the mean ΔCT of the experimental group sample and less than the mean ΔCT of the control group sample (used as a calibration parameter).

2.5. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). For multiple comparisons, one-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA, followed by the Bonferroni or Tukey's post-hoc test was used, adopting significance levels as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Palatable diet intake

The effect of maternal separation on the consumption of palatable diet indicated alteration both in the light [F (3,36) = 24.23, $P < 0.001$, one-way ANOVA] and the dark phase intakes [F (3, 36) = 15.01, $P < 0.001$, one-way ANOVA]. Calories consumed from palatable diets were higher in male rats, and female rats separated both in the light (MC = 12.1 ± 0.46 vs MSL = 17.56 ± 0.88 , $n = 10$, $P < 0.001$, FC = 14.31 ± 0.35 vs FSL = 19.39 ± 0.68 , $n = 10$, $P < 0.001$, Fig. 1A) and the dark phases (MC = 12.1 ± 0.46 vs MSD = 16.11 ± 0.50 , $n = 10$, $P < 0.001$, FC = 14.31 ± 0.35 vs FSD = 16.48 ± 0.55 , $n = 10$, $P < 0.05$, Fig. 1B).

3.2. Brainstem drd1a and drd2a dopamine receptors expression

Maternal separation caused a significant upregulation of the gene expression of Drd1a and Drd2a in the brainstem of male rats separated in the dark phase as compared with the control rats (drd1a: MC; 1.07 ± 0.166 vs MSD; 1.79 ± 0.06 , $p < 0.01$; drd2a: MC; 1.07 ± 0.166 vs MSD; 1.73 ± 0.05 , $p < 0.001$). This effect was dependent on the sex (drd1a: MSD; 1.79 ± 0.06 vs FSD; 0.68 ± 0.07 , $p < 0.001$; drd2a: MSD; 1.73 ± 0.05 vs FSD; 1.08 ± 0.1 , $p < 0.001$) and phase in which the separation occurred (drd1a: MSD; 1.79 ± 0.06 vs MSL; 1 ± 0.03 , $p < 0.001$; drd2a: MSD; 1.73 ± 0.05 vs MSL;

0.68 ± 0.07 , $p < 0.001$). (see Fig. 2)

4. Discussion

The present study showed that maternal separation increases palatable dietary intake in both male and female rats regardless of the luminosity phase in which their early life stress paradigm occurred. Only the early stress induced during the dark phase of the luminosity cycle increased the gene expression of the dopaminergic receptors Drd1a and Drd2a. This effect was observed only in male rats.

The dam-pup relationship is essential for the neural development of neonatal rats. Disruption of the dam-pup attachment can disrupt the neural processes and affect the development of regions that control feeding behavior. Some of these regions such as the paraventricular nucleus, the prefrontal cortex, and the amygdala showed greater neuronal activation in response to maternal separation (Hori-Hayashi et al., 2013). In addition, the expression of neuropeptides that control feeding behavior in the hypothalamic arcuate nucleus (Arc) was altered after food deprivation in female rats who were separated in the first 2 weeks of their life (Yoo et al., 2011). These modifications have also been demonstrated at the behavioral level. Maternal separation has been associated with increased consumption of palatable cafeteria diet (Maniam & Morris, 2010), increased consumption of standard diet during the light phase, at times when rats eat less, and earlier satiety (da Silva et al., 2014), indicating the relationship between early life stress and long-term eating behavior modifications. Particularly, the ingestion of foods rich in simple sugars and fat have been suggested to be capable of bringing comfort to animals stressed in early life. In this case, these foods are ingested not only for the purpose of supplying the energy needs but also for their value as a reward. Thus, we suggest that the higher palatable diet intake in the separated group may be associated with alterations in the neural circuits that regulate the eating behavior and reward.

Increased Drd1 and Drd2 dopamine receptors expression in the brainstems of male rats separated in the dark phase were observed in this study. Only few studies have evaluated the gene expression of these receptors in the brain in response to maternal separation stress. Increased Drd3 and Drd2 expression in the medial prefrontal cortex (mPFC) and nucleus accumbens (NAc) of male and female rats have been reported after induction of combined neonatal and young-adult stress (Hill et al., 2014). In addition, the increased expression of Drd1 in the caudate putamen (CPu) and Drd2 in the prefrontal cortex (PFC) have been reported in female rats that were maternally separated in their childhood (Majcher-Maslanka, Solarz, Wedzony, & Chocyk, 2017). To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the expression of these receptors in the brainstem in response to maternal separation stress. We focused on Drd2 because Drd1 have not been reported in the rat midbrain. The midbrain region comprises the most rostral part of the brainstem, which contains the largest amount of dopamine-producing neurons in the substantia nigra (SN) and ventral tegmental area (VTA). Only type 2 receptor transcripts were found in the midbrain, encouraging the proposition that this receptor is the only autoreceptor found in this region (Meador-

Table 2
Sequence of primers designed for the study of drd1a, drd2a, and the reference constitutive gene gapdh.

Primers	Forward	Reverse
Drd1	5'-CTG GAC GAC ACC CAG GAT CAC-3'	5'-CTC CAT GAC GGA CGA TCA AAT GC-3'
Drd2	5'-CAA CAA TAC AGG CAA ACC AGA ATG AG-3'	5'-ACC AGC AGA GTG ACC ATG AGC G-3'
Gapdh	5'-GCGAGATCCCTCAAGATCA-3'	5'-CCACAGCTCTCTGAGTGGCAG-3'

J.A. de Souza et al. / Appetite 123 (2018) 114–119

117

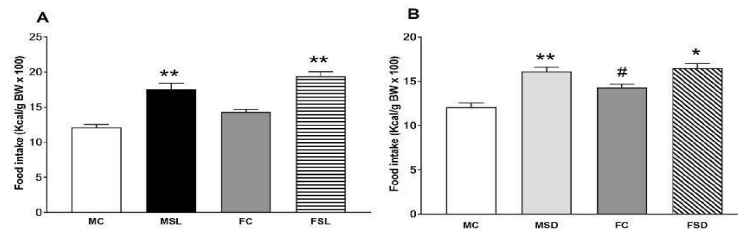


Fig. 1. Effect of maternal separation on the dietary intake of palatable diet. The animals were separated from mothers from day 1–14 of life ($n = 10$) in the light (MSL and FSL) or dark phases (MSD and FSD) of the circadian cycle, or they were kept with their mothers (MC and FC). Consumption of palatable diet was performed at 120 days of age during a 1-h period. One-way ANOVA, Bonferroni post-hoc, $n = 10$. Values are presented by mean $\pm$ SEM. * Difference with the respective control, #sex difference.

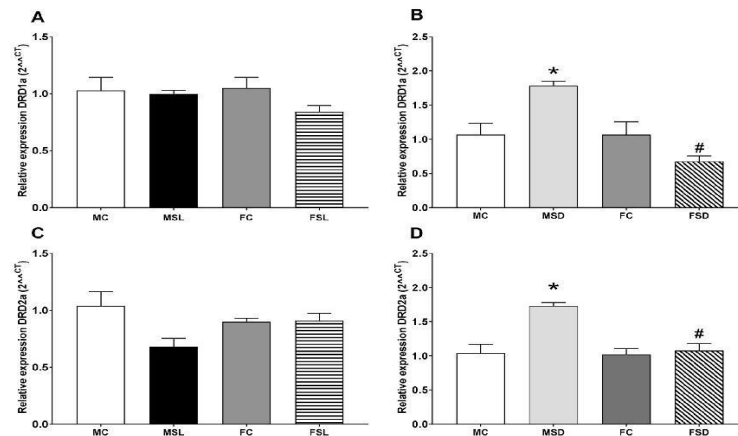


Fig. 2. Effect of maternal separation on the Drd1a (Fig A and B) and Drd2a (Fig C and D) dopamine receptors expression. The animals were separated from mothers from day 1–14 of life ($n = 10$) in the light (MSL and FSL, Fig A and C) or dark phases (MSD and FSD, Fig B and D) of the circadian cycle, or they were kept with their mothers (MC and FC). The gene expression was performed at 180 days of age during a 1-h period. Two-way ANOVA, post-hoc Tukey's, $n = 5$. Values are presented by mean $\pm$ SD. * vs MC, # vs MSD.

Woodruff et al., 1991). Increased autoreceptor function decreases the dopamine signaling and the upregulation in Drd2 receptor observed in this study, which may suggest an attempt to decrease the dopaminergic signaling in the downstream regions. Increased dopamine release in response to stress or α -amphetamine has been reported in maternally separated animals in the downstream regions such as the hippocampus and NAc (Jahng, Yoo, Kim, Kim, & Lee, 2012) (Hall, Wilkinson, Humby, & Robbins, 1999), which reinforces this suggestion. On the other hand, a weakness of the method is that neurochemical measures were done in the whole

brainstem rather than in specific regions and the results may also represent the expression in nuclei such as the dorsal tegmental, lateral lemniscus, locus coeruleus, parabrachial, and trigeminal, as well as the rostral nucleus of the solitary tract, which also expresses the Drd2 receptor type (Mansour et al., 2000).

As previously mentioned, the Drd1 transcripts were not detected in the midbrain, suggesting that, in the brainstem, this receptor may not act as an autoreceptor (Meador-Woodruff et al., 1991). The Drd1 expressing cells have been detected in the locus coeruleus, lateral parabrachial, facial nuclei, and raphe nuclei, especially in the

dorsal raphe (Mansour et al., 2000). The dorsal raphe nucleus (DRN) presents great connections with the VTA. This pathway is associated with rewarding effects from DRN stimulation and is dependent on Drd1 in this nucleus (McDevitt Ross et al., 2014). Thus, our findings may suggest that Drd1 up-regulation may be associated with alterations in the reward effects resulting from the communication between these areas. On the other hand, we cannot eliminate a possible influence of the greater expression of Drd1 on the serotonergic neurons—the largest population of raphe neurons (Jacobs & Azmitia, 1992). Another area that can be influenced by dopamine acting through Drd1 is the locus coeruleus (LC). LC also expressed Drd1 and is dependent on Drd1 activation to attenuate naloxone-induced withdrawal (Iraj Mirzaei, SMK, Mohammad Reza, & Hamid, 2005). Past studies have demonstrated that withdrawal from highly palatable diets is associated with attenuation of withdrawal-like symptoms (Davis, 2013), while maternal separation is associated with highly palatable diet intake. Thus, it is tempting to speculate that the Drd1 upregulation in the brainstem together with higher palatable diet intake, both seen in the present study, is associated with attenuation of increased negative emotional state.

We demonstrated in this study a temporal effect of separation in which male rats separated in the dark phase showed increased Drd1 and Drd2 expression in the brainstem as compared to the male rats separated in the light phase. We demonstrated that maternal care influences the maternal and offspring dopaminergic system (Champagne et al., 2004; Pena, Neugut, Calarco, & Champagne, 2014). Maternal licking/grooming (LG) behavior directed to pups increased the dopamine signal in the NAc in the voltammetry analysis of dams. The magnitude of the increase was greater in naturally high-LG mothers as compared to low-LG mothers. Besides, the elevated levels of Drd1 and Drd3 (Drd2-like) binding sites were detected by autoradiographic analysis in the NAc of dams (Champagne et al., 2004). In the offspring, high-LG increased tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in the ventral tegmental area and dopamine Drd1, Drd2 and Drd3 receptors mRNA levels within the NAc (Pena et al., 2014). Maternal separation is associated with high-LG behavior (Macri, Mason, & Wurbel, 2004). This elevated LG is particularly evident in the 4 h following the reunion (Macri et al., 2004). In the current study, litters were separated in the first 6 h of the dark or light phases. Considering the high-LG reported in maternally separated dams following the reunion, it can be reasonably suggested that the litters separated in the dark received this increased care while still in the dark phase. Unlike this, the litters separated in the light seem to have received this increased care while still in the light phase. Under normal conditions, maternal care is elevated in the light phase as compared to that in the dark phase of the total cycle (Jensen Pena & Champagne, 2013). Thus, we suggest that an unusual augmented maternal care in the dark phase may be associated with the elevated levels of Drd1 and Drd2 in the brainstem demonstrated only in the litters separated in the dark phase. Furthermore, this increase is sex dependent as it was demonstrated only in male rats, but not in female rats.

The sex-dependent differences may suggest a differential maternal care directed to male and female pups or a contribution of gonadal hormones on the Drd1 and Drd2 expression. It has been shown that, in normal conditions, male rats received higher levels of LG than female rats (Moore & Morelli, 1979). Female rats separated from their mothers from postnatal days 1–17 become low-caring mothers in the adulthood (Lovic, Gonzalez, & Fleming, 2001). In rats, there is evidence that the maternal care pattern is passed from mothers to daughters during the lactation period. Thus, daughters of high-LG mothers repeat the pattern with their pups and daughters of low-LG mothers become low-LG mothers

(Champagne, Francis, Mar, & Meaney, 2003). In the present study, it was not assessed whether female rats received less care than male rats and whether this care was directly associated with the expression of dopaminergic receptors. Therefore, our data suggest, but do not prove, that differential maternal care directed to the stressed offspring influences the sexual dimorphism in the expression of the dopaminergic receptors. In addition, an influence of gonadal hormones cannot be excluded. We have not conducted an assessment of the estrous cycle of female rats used in the study but other authors have reported a relationship between gonadal hormones and the expression of the dopaminergic receptors. The absence of estrogen in ovariectomized rats has been associated with the higher expression of Drd2 dopamine receptor in the NAc and caudate nucleus (Chavez et al., 2010). In male rats, estrogen treatment increased the density of Drd1 in the striatum (Hruska & Nowak, 1988). Testosterone and dihydrotestosterone replacement could increase the expression of Drd2 and Drd1 mRNA, respectively, in the substantia nigra of gonadectomized rats (Purves-Tyson et al., 2014). Together, these findings demonstrated the influence of gonadal hormones on the central expression of dopamine receptors. On the other hand, only few studies have evaluated the impact of maternal separation on the reproductive system, and the results are not consistent (Greisen, Bolwig, Husum, Nedergaard, & Wortwein, 2005; Rhees, Lephart, & Eliason, 2001). Regarding the relationship between maternal separation and gonadal hormones, a study evaluated the testosterone serum levels during early puberty in these animals. An increase in testosterone between days 38 and 40 was observed in the separated group, while, in the control group, an increase occurred later at days 40–42. As compared to controls, separated animals had lower testosterone levels at day 42 (Bodensteiner, Christianson, Siltumens, & Krzykowski, 2014). In another study, no changes were observed in the estradiol levels in separated animals (Paternain et al., 2012). Thus, further studies are needed to clarify the relationship between maternal separation, steroid hormones, and the dopaminergic system.

In conclusion, the present study demonstrated that maternal separation during lactation affects feeding, regardless of the sex or phase of the circadian cycle in which the separation occurs. At the molecular level, separation stress promotes significant adjustments in the expression of dopaminergic receptors in the brainstem of male rats only. These molecular adjustments depend on the phase of the circadian cycle, in which the separation occurs, with the dark phase showing the greatest impact on the gene expression. Together, these findings dissociate the feeding effects from the dopamine receptor expression, which suggests that the dopamine receptor expression changes are not necessary for the feeding changes in males.

Acknowledgments

This work was supported by Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (1410.4.05/12), the National Council for Scientific and Technological Development and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (484726/2012-9). The authors also thank the research group Neuroplasticity and Behavior.

References

- Amiri, S., Amini-Khoei, H., Mohammadi-Asl, A., Alijanpour, S., Haj-Mirzaian, A., Rahimi-Balaei, M., et al. (2016 Sep 01). Involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the antidepressant-like effects of selegiline in maternal separation model of mouse. *Physiol Behav*, 163, 107–114.
- Bodensteiner, K. J., Christianson, N., Siltumens, A., & Krzykowski, J. (2014). Effects of early maternal separation on subsequent reproductive and behavioral outcomes in male rats. *Journal of General Psychology*, 141(3), 228–246.