

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

**Ruth Novais Amaral**

**EFEITOS DO ESTRESSE CAUSADO PELA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O  
TAMANHO DA REFEIÇÃO E A ATIVAÇÃO NEURONAL NO NÚCLEO  
ACCUMBENS**

**RECIFE**

**2022**

**RUTH NOVAIS AMARAL**

**EFEITOS DO ESTRESSE CAUSADO PELA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O  
TAMANHO DA REFEIÇÃO E A ATIVAÇÃO NEURONAL NO NÚCLEO  
ACCUMBENS**

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

Área de concentração: Bases  
experimentais da Nutrição

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elizabeth do Nascimento  
Coorientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Julliet Araújo de Souza

**RECIFE**

**2022**

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

Amaral, Ruth Novais.

Efeitos do estresse causado pela separação materna sobre o tamanho da refeição e a ativação neuronal no núcleo accumbens / Ruth Novais Amaral. - Recife, 2022.

39 : il.

Orientador(a): Elizabeth do Nascimento

Coorientador(a): Julliet Araújo de Souza

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

1. Neuroplasticidade. 2. Comportamento Alimentar. 3. Separação Materna. 4. Estresse. 5. Núcleo Accumbens. I. Nascimento, Elizabeth do. (Orientação). II. Souza, Julliet Araújo de. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

RUTH NOVAIS AMARAL

**EFEITOS DO ESTRESSE CAUSADO PELA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O  
TAMANHO DA REFEIÇÃO E A ATIVAÇÃO NEURONAL NO NÚCLEO  
ACCUMBENS**

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

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovado em: 27/10/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Julliet Araújo de Souza (Co-orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Matilde Cesiana da Silva (Examinadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Tássia Karin Ferreira Borba (Examinadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Primordialmente à Deus, o principal responsável por todo o desenvolvimento e conclusão deste trabalho me dando forças e motivação para executá-lo.

À minha querida mãe que nunca mediu esforços para que eu conquistasse tudo que sempre almejei e tornou possível que concluísse essa etapa com todo fomento necessário.

Ao meu pai e meus irmãos que sempre me apoiam em suas singularidades e estão sempre liderando a minha torcida.

À Marcelo, meu amor, por todo companheirismo e compreensão durante esse período.

Aos meus parceiros da vida Jhonatta e Arielly pela companhia e disponibilidade em tornar alguns momentos pesados em leves e mais fáceis de levar.

Às minhas meninas Amanda, Andrea, Larisse e Thaís (Everton e Junior também) por todo apoio acadêmico que se estendeu para a vida e foram responsáveis por criar momentos únicos trazendo graça à caminhada.

À Julliet, professora na sala de aula, no laboratório e na vida e também a maior responsável por incentivar o prazer em desenvolver a ciência.

Todos, inclusive os não mencionados, foram essenciais para que não só se desse a finalidade deste trabalho, mas por me apoiar, cuidar, incentivar e acreditar em mim sempre que precisei.

## RESUMO

O período inicial da vida é um estágio determinante para o desenvolvimento, neste momento fatores ambientais possuem grande importância e, por isso, este momento necessita de investigação quanto às questões como o comportamento alimentar. Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do estresse causado pela separação materna sobre o tamanho da refeição e a ativação neuronal do Núcleo Accumbens em ratos Wistar. Para esta avaliação foi realizado um estudo experimental em que, um grupo foi submetido à separação materna durante de 14 dias, do dia pós-natal 2 (PND2) ao PND 14, a separação teve a duração de 3h e aconteceu das 8h às 11h. Após esse período os animais permaneceram com suas mães até o desmame, no PND 22. Os animais foram, então, submetidos a uma situação estressora durante 21 dias a partir do 60º dia de vida. Este estresse consistiu na exposição, olfativa e visual, do animal a um alimento palatável sem a possibilidade de consumo, por 20 minutos. No último dia, o dia 81, após a exposição, foi permitido o consumo durante 1h. Em seguida, foi quantificado o tamanho da refeição através da: 1) subtração entre a quantidade ofertada e rejeitada; 2) multiplicação pelo valor em calorias e 3) divisão pelo peso do animal. Após a ingestão do alimento os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de perfusão, preservando seu encéfalo. Estes foram criossecionados e os cortes contendo o Núcleo Accumbens foram marcados através da imunohistoquímica. A ativação neuronal do Núcleo Accumbens foi avaliada pela expressão da proteína FOS através da imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que houve diminuição no tamanho da refeição com a dieta palatável pelo grupo separado (C:  $355,9 \pm 29,9$  vs SM:  $316,9 \pm 38,6$ ,  $n=10-11$ ,  $p = 0,0175$ ) e que a ativação neuronal do Núcleo Accumbens em resposta ao estresse foi semelhante em ambos os grupos. Portanto, foi possível concluir que a separação materna somada ao estresse alimentar diminuiu o tamanho da refeição sem alterar a ativação neuronal no Núcleo Accumbens, indicando que a dupla exposição ao estresse em diferentes fases do desenvolvimento, altera o comportamento alimentar em longo prazo, diminuindo o tamanho da refeição, quando quantificada caloricamente.

**Palavras-chave:** Separação materna; Tamanho da refeição; Núcleo Accumbens.

### **ABSTRACT**

The initial period of life is a determining stage for development; at this time environmental factors are of great importance and, therefore, this moment requires investigation regarding issues such as feeding behavior. Thus, this study aimed to analyze the effects of stress caused by maternal separation on meal size and neuronal activation of the Nucleus Accumbens in Wistar rats. For this evaluation an experimental study was conducted in which one group was subjected to maternal separation for 14 days, from postnatal day 2 (PND2) to PND 14, the separation lasted 3h and took place from 8am to 11am. After this period the animals remained with their mothers until weaning at PND22. The animals were then subjected to a stressful situation for 21 days from day 60 of life. The stress consisted of exposing the animal visually and olfactually to a palatable food, without the possibility of consumption, for 20 minutes. On the last day, day 81, after exposure, the animal was allowed to eat for 1h. The size of the meal was then quantified by subtracting the amount offered and the amount rejected. After the ingestion of the food, the animals were euthanized by the perfusion method, preserving their encephalon. These were cryosectioned and the sections containing the Nucleus Accumbens were marked by immunohistochemistry. The neuronal activation of the Nucleus Accumbens was evaluated by the expression of FOS protein through immunohistochemistry and from this it was possible to identify that there was a decrease in the size of the meal with the palatable diet by the separate group (C:  $355,9 \pm 29,9$  vs SM:  $316,9 \pm 38,6$ ,  $n=10-11$ ,  $p = 0,0175$ ) and that the neuronal activation of the Nucleus Accumbens in response to stress was similar in both groups. It was possible to conclude that maternal separation plus feeding stress decreases meal size without altering neuronal activation in the Nucleus Accumbens, indicating that double exposure to stress at different developmental stages alters long-term feeding behavior, decreasing the size of the meal, when calorically quantified.

**Palavras-chave:** Maternal Separation; Meal size; Accumbens Nucleus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeitos da separação materna sobre o tamanho da refeição com alimento palatável após estresse alimentar. 26

Figura 2 – Efeito da separação materna sobre a imunorreatividade da proteína FOS no núcleo accumbens em resposta ao estresse crônico em ratos jovens. 27

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>12</b>
2.1. Períodos críticos do desenvolvimento	12
2.2. Estresse	12
2.3. Separação materna	14
2.4. Comportamento Alimentar	15
2.4.1 Comportamento Alimentar Homeostático	16
2.4.2. Comportamento alimentar hedônico	18
2.5. Comportamento alimentar hedônico e o Núcleo Accumbens	19
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivo Específico	21
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.1 Animais	22
4.2 Separação materna e formação dos grupos experimentais	22
4.3 Ingestão de alimento palatável após estresse alimentar	23
4.4 Tamanho da refeição	23
4.5 Eutanásia	23
4.6 Perfusão	24
4.7 Imunohistoquímica	24
4.8 Estatística	25
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
5.1. Tamanho da refeição	26
5.2. Ativação neuronal no Núcleo Accumbens	26
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As observações epidemiológicas levaram à hipótese de que o risco de desenvolver algumas doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta é influenciado não só por fatores genéticos e de estilo de vida adulta, mas também por fatores ambientais que atuam no início da vida. Sendo assim, o surgimento das doenças ocorre devido à perturbação da rota de desenvolvimento em consequência de experiências precoces adversas. Esta é uma hipótese sustentada pela área de estudo denominada Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (GLUCKMAN e HANSON, 2004).

Em modelos animais, essas situações adversas podem ser mimetizadas pela separação materna. Este é um modelo experimental de estresse precoce realizado com animais neonatos que consiste em separá-los da mãe na fase da lactação, mais precisamente, nos primeiros quatorze dias de vida pós-natal, denominados de Período Hiporresponsivo ao Estresse (PHRE). O protocolo mais comumente utilizado é a separação diária, por cerca de 3 horas, nas duas primeiras semanas de vida (HANCOCK e GRANT, 2009).

A separação materna está diretamente ligada a alterações no comportamento alimentar. Animais que sofreram a separação materna na fase de lactação demonstraram preferência por dieta palatável (MANIAM e MORRIS, 2010), também demonstraram hiperfagia (RYU et al., 2009) além de antecipação na saciedade (DA SILVA et al., 2014).

Essas alterações comportamentais podem estar associadas a alterações moleculares no Sistema Nervoso. Diversas áreas encefálicas se desenvolvem após o nascimento, tornando o encéfalo mais sensível a influências ambientais durante esse período. A separação materna vem sendo utilizada como modelo de estresse perinatal, pois é capaz de aumentar os níveis de corticosterona e ativar o eixo HPA (Hipotálamo, Pituitária, Adrenal), responsável pela liberação de glicocorticoides, mesmo durante o PHRE (SOUZA, 2020). Além dessas alterações nas respostas do

Hipotálamo, da Pituitária e da Adrenal, áreas corticolímbicas também parecem ser alvo da separação materna.

A dopamina, neurotransmissor liberado no Núcleo Accumbens, tem sido relacionada à recompensa de forma geral e, especificamente, à recompensa alimentar (WISE, 2004; MACEDO; FREITAS; TORRES, 2016). Por exemplo, animais separados apresentam maior expressão gênica dos receptores *drd1* e *drd2* no tronco encefálico, o qual possui regiões como a Área Tegmentar Ventral, importante na regulação da resposta a recompensas (SOUZA, 2018). Embora o Núcleo Accumbens também esteja envolvido nessas respostas, ainda não se sabe os efeitos da separação materna sobre a ativação neuronal nessa região em associação com o tamanho da refeição. Sendo assim, o presente trabalho tem como hipótese que a separação materna aumenta o tamanho da refeição com uma dieta palatável e a ativação neuronal do Núcleo Accumbens em resposta ao estresse alimentar.

Este trabalho ressalta a importância do período inicial da vida no estabelecimento do estado de morbimortalidade na vida adulta. Nesse sentido, os dados aqui produzidos podem ter impacto no desenvolvimento de iniciativas que visem promover o bom crescimento e desenvolvimento como estratégias de promoção da saúde mais tarde na vida.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. Períodos críticos do desenvolvimento**

A exposição ambiental a qual o indivíduo é submetido no período inicial de seu desenvolvimento, ainda na infância, possui um papel determinante na expressão de fatores relacionados à saúde no decorrer da vida (LEA *et al*, 2018).

A exposição a ambientes diferentes pode fazer com que indivíduos que compartilham o mesmo genótipo expressem fenótipos diferentes. Isso acontece por decorrência do tipo de ambiente ou situações às quais esses indivíduos tenham sido expostos de forma singular. A possibilidade dos indivíduos adaptarem-se e reagirem de forma diferenciada aos fatores externos apesar das características genóticas semelhantes durante as diferentes fases do seu desenvolvimento é denominada plasticidade do desenvolvimento. (LEA *et al*, 2018).

Essa plasticidade ocorre em vários níveis organizacionais do sistema nervoso e, neste, é denominada neuroplasticidade. Esta é responsável pela realização das mudanças adaptativas que ocorrem de forma estrutural e funcional em toda a extensão do encéfalo. (PUDERBAUGH e EMMADY, 2022).

A neuroplasticidade está diretamente relacionada com processos que ocorrem na formação da rede neural durante o processo de desenvolvimento do indivíduo e no decorrer de sua vida, através da conquista da atividade motora e do aprendizado (VON BERNHARDI, 2017). A complexidade que abrange a plasticidade neural compreende processos como neurogênese, alterações que ocorrem na excitabilidade neuronal e na neurotransmissão, bem como modificações e criação de novas conexões neurais. (VON BERNHARDI, 2017). Dentre as experiências ambientais que podem levar a modificações fenotípicas está o estresse.

### **2.2. Estresse**

O estresse corresponde a um estado de homeostase ameaçada, a qual pode ser deflagrada por estímulos intrínsecos ou extrínsecos, denominados agentes estressores. Esses estímulos mobilizam um repertório de respostas fisiológicas e

comportamentais que visam manter ou restabelecer o equilíbrio do meio interno (TSIGOS, 2020).

A resposta adaptativa ao estresse possui, pelo menos, dois componentes principais: o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). O primeiro provê uma resposta de natureza neural de curta duração, o segundo provê uma resposta humoral mais duradoura (GAO *et al.*, 2016; KORIM *et al.*, 2016; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

A ativação do SNA aumenta os níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina, habilitando o indivíduo a expressar uma resposta de luta ou fuga. Em geral, ocorre aumento da frequência cardíaca, vasoconstrição periférica e mobilização de substratos energéticos (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

A ativação do eixo HPA, por sua vez, aumenta os níveis plasmáticos de glicocorticoides, promovendo aumento da glicogenólise, da lipólise, da proteólise, da gliconeogênese e suprimindo as ações anabólicas de hormônios como a insulina, os esteroides sexuais e o hormônio do crescimento, em seus órgãos-alvo (CHROUSOS, 2000).

No início da vida, essa resposta ao agente estressor possui características próprias fazendo com que esse período seja denominado de Período Hiporresponsivo ao Estresse (PHRE) (SILVA, 2013). Nesse período, a maioria dos agentes estressores não é capaz de ativar o eixo HPA de maneira que leve ao aumento dos níveis circulantes de glicocorticoides. Isso ocorre devido a algumas características das estruturas que compõem o eixo. Essas estruturas se comunicam entre si através de hormônios. Quando ativado por uma situação estressora, uma área do hipotálamo, denominada de Núcleo Paraventricular (PVN), libera o Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), o qual age sobre a pituitária estimulando-a a liberar o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. Este age sobre a glândula adrenal estimulando-a a liberar os glicocorticoides, cortisol em humanos e corticosterona em roedores. No PHRE, a glândula adrenal apresenta sensibilidade reduzida ao ACTH com aumento mínimo dos níveis circulantes de glicocorticoides. Isso se configura como um mecanismo protetor, uma vez que elevados níveis de glicocorticoides no início da vida podem inibir o crescimento encefálico, a divisão e metabolismo neuronal, o desenvolvimento dos dendritos, dentre outros efeitos deletérios (LUPIEN *et al.*, 2009).

Em ratos, os níveis de corticosterona aumentam ao nascimento. Porém, caem acentuadamente até o segundo dia de vida e permanecem assim durante todo o PHRE. Somente no desmame, por volta do 21º dia de vida, os níveis hormonais atingirão valores semelhantes àqueles dos adultos (SAPOLSKY e MEANEY, 1986). Contudo, esse aumento dos níveis de corticosterona podem ocorrer mesmo durante o PHRE se alguma situação suficientemente estressora for enfrentada. Em roedores, uma dessas situações é a separação materna (HUOT *et al.*, 2002).

### **2.3. Separação materna**

A separação materna tem se estabelecido como um modelo de estresse precoce em roedores. Ela consiste na separação diária entre a mãe e a ninhada, por algumas horas, durante as duas primeiras semanas de vida, período correspondente ao PHRE. A prática mais comum é a separação por três horas, mas também há protocolos com separação por 2, 4, 6, 8 e até 24h (SOUZA *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2014; LEVINE, 1991).

Os efeitos estressores da separação ocorrem porque a relação mãe-filhote é essencial para manter o PHRE (LUPIEN *et al.*, 2009). A participação materna se dá através do estímulo tátil, da alimentação e dos comportamentos maternos de cuidado com a prole, os quais, juntos, contribuem para mitigar a atividade do eixo HPA (LUPIEN *et al.*, 2009).

O desenvolvimento à idade adulta pode receber influência direta de diferentes interações iniciais entre a mãe e o filhote. Alguns estudos experimentais trazem evidências sobre a relação do tempo de contato entre mãe e filhote e a variedade de diferenças somáticas e comportamentais. Animais separados são mais ansiosos e depressivos (SOUZA, 2020) (VETULANI, 2013) e apresentam alterações estruturais como, por exemplo, maior expressão gênica de receptores dopaminérgicos no tronco encefálico (SOUZA, 2018). Também é observado que essa interação modifica, de forma sistemática, o desenvolvimento da resposta ao estresse através do eixo HPA. Esses animais apresentam-se hiper responsivos ao estresse, com maior liberação de corticosterona em resposta ao estresse de contenção (LEHMANN *et al.*, 2002) e maiores níveis de receptores de CRH na amígdala após estresse de choque elétrico nas patas (BARNA *et al.*, 2003). Em parte, essas modificações também estão ligadas às alterações que ocorrem nos

receptores de corticosterona do animal, controlados pelas alterações gênicas. (KOLB, 2011).

Um ponto a se destacar sobre as consequências deletérias do estresse precoce, como a separação materna, é o fato de que seus efeitos em longo prazo são melhor vistos após uma segunda experiência estressora. Esse conceito é abarcado pela hipótese da "dupla-batida" (do inglês "*two-hit*"). Essa hipótese sugere que a doença surge como consequência de uma combinação de fatores adversos ao longo do desenvolvimento. O primeiro "hit" ocorreria no período crítico, como a lactação. Este aumentaria a vulnerabilidade do sistema nervoso a um segundo "hit" mais tarde no desenvolvimento (adolescência e vida adulta), podendo deflagrar o aparecimento da doença (HILL, 2014). Nesse sentido, a separação materna pode ser considerada o primeiro "hit", o qual aumenta a vulnerabilidade do sistema nervoso a uma experiência posterior com o estresse (o segundo "hit") (SOUZA, 2020).

Essa vulnerabilidade do sistema nervoso é observada ao se avaliar o comportamento dos animais separados durante a lactação. Além das alterações nos comportamentos emocionais, já citadas anteriormente, há modificações do comportamento alimentar nesses animais (MANIAM e MORRIS, 2010). É observada a antecipação da saciedade (DA SILVA *et al*, 2014), aumento da ingestão de alimentos palatáveis (MANIAM e MORRIS, 2010) e hiperfagia de rebote (RYU *et al.*, 2009).

#### **2.4. Comportamento Alimentar**

O comportamento alimentar envolve tanto o ato de ingerir alimentos e os mecanismos subjacentes que regulam essa ação, quanto os mecanismos, neurais e humorais, que inibem o consumo (GRIMM e STEINLE, 2011). Além disso, é influenciado por fatores como a composição do alimento, seu odor, textura e temperatura, bem como os fatores relacionados ao ambiente. Nesse sentido, o comportamento alimentar não é dirigido apenas pelas necessidades energéticas do organismo, mas o aprendizado social relacionado à refeição, bem como as características que a tornam mais ou menos prazerosa, também regularão esse comportamento (GAHAGAN, 2012). Por essa razão, para fins didáticos, o

comportamento alimentar tem sido dividido em dois componentes, o homeostático (dirigido pela necessidade energética) e o hedônico (dirigido pelo prazer).

#### **2.4.1 Comportamento Alimentar Homeostático**

Uma das principais áreas envolvidas na regulação do comportamento alimentar homeostático é o hipotálamo. Esta região recebe diversos sinais de outras áreas do Sistema Nervoso Central e da periferia e age, em resposta, regulando as funções desempenhadas pela glândula tireoide, pelas glândulas adrenais, pelos órgãos reprodutivos, influenciam o crescimento, o balanço hídrico, o controle da temperatura, a regulação do Sistema Nervoso Autônomo e o controle do consumo alimentar (SHAHID, 2022). O hipotálamo pode ser identificado como o principal centro de controle da ingestão alimentar e do peso. Se destacam duas áreas presentes neste, o Núcleo Ventromedial (VMN) e a Área Hipotalâmica Lateral (LHA), também denominadas de “centro de saciedade” e “centro da fome”, respectivamente (BRAY, G. A., FISLER, J. & YORK, D. A., 1990). Estas denominações secundárias dizem respeito à capacidade do VMN de, através de um estímulo elétrico, promover a saciedade e, em casos que se apresentem lesões na área, promover maior susceptibilidade à hiperfagia e obesidade. Por outro lado, o estímulo ou lesão da LHA promove a resposta contrária.

Uma das principais regiões hipotalâmicas envolvidas na regulação do comportamento alimentar é o Núcleo Arqueado (ARC). Nele, há populações neuronais distintas envolvidas no controle da ingestão. Uma dessas populações sintetiza um neuropeptídeo denominado de neuropeptídeo Y (NPY), o qual estimula o consumo alimentar. Há também, por decorrência de sua ação, a diminuição do gasto energético simultâneo à indução de enzimas lipogênicas no fígado e no tecido adiposo branco.

O NPY se apresenta como uma molécula de sinalização anabólica, visto que a expressão do gene *npy* e a secreção do peptídeo NPY, no hipotálamo, apresentam uma elevação durante a depleção ativa dos estoques de gordura corporal e/ou redução da sinalização da leptina/insulina para o encéfalo (hormônios que inibem o consumo alimentar) (ZARJEVSKI, *et al*, 1993).

A leptina inibe a expressão do gene NPY do núcleo arqueado, e o silenciamento do seu gene caracteriza uma redução na hiperfagia e diminuição da

obesidade em ratos, o que indica que a sinalização por NPY está envolvida na resposta à deficiência de leptina. Por outro lado, a hiperfagia no Diabetes Mellitus é seguida do aumento da síntese e da liberação do NPY hipotalâmico. Esta resposta é inativada pela liberação da insulina, tanto de forma sistêmica quanto diretamente no cérebro.

Outro neuropeptídeo do ARC com ação orexígena é a Proteína Relacionada ao Gene Agouti (AGRP). Sua identificação foi realizada após clonagem, e demonstrou-se como um antagonista dos receptores de melanocortina MC3 e MC4. Este último, agindo na inibição da ingestão alimentar. Assim, o antagonismo do MC4 pelo AgRP, tem o efeito oposto, aumentando o consumo (MOUNTJOY, *et al*, 1994).

O NPY, ainda que descrito na literatura como a mais potente molécula de ordem orexígena pela sua ação no aumento do gasto energético, possui efeito de curta duração, se comparado ao AGRP, quando a resposta alimentar é medida em um curto intervalo de tempo. Desse modo, o AGRP deve ser considerado como a molécula de classe orexígena mais robusta como componente auxiliador no aumento do gasto energético.

As moléculas de sinalização efetoras catabólicas apresentam efeito oposto ao NPY/AgRP. Dentre essas moléculas, estão o Hormônio Estimulador de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH) (CONE, 1996), como também o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) (BRAY; FISLER; YORK, 1990), o Hormônio Liberador Tireotropina (TRH) (KOW; PFAFF, 1991), a Interleucina-1 $\beta$  (LUHESHI, *et al*, 1999) e o Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina (CART) (KRISTENSEN, *et al*, 1998). Como resposta à elevação dos sinais de adiposidade no cérebro, a síntese desses peptídeos é aumentada. Dentre esses peptídeos, merece destaque o sistema de melanocortinas pela sua importância e sua complexidade na homeostase energética.

As melanocortinas (MC) são peptídeos que realizam suas funções quando ligados a outros receptores de melanocortinas e são clivados da molécula precursora Pró-opiomelanocortina (POMC) (CONE, *et al*, 1996). Através de estudos experimentais foi possível identificar que ratos que não possuem o receptor Melanocortina 4 (MC4) apresentam obesidade e hiperfagia, demonstrando que a sinalização do receptor MC4 diminui a ingestão alimentar e o índice de gordura corporal (HUSZAR, 1997). As populações neuronais que sintetizam POMC e CART

fazem o contraponto àquelas produtoras de NPY/AgRP na regulação do consumo alimentar.

Os axônios dos neurônios NPY/AGRP e POMC/CART, por sua vez, suprem outras áreas hipotalâmicas específicas, como o núcleo paraventricular (PVN), a Área Perifornical (PFA) e a LHA. O estímulo da LHA e da PFA adjacente gera hiperfagia, enquanto o estímulo do PVN gera o efeito contrário, inibindo a ingestão de alimentos. O PVN, quando lesionado, pode gerar um quadro de obesidade hiperfágica no indivíduo, enquanto que a LHA, quando lesionada, pode gerar no indivíduo um quadro de perda de peso e anorexia. A partir desse conhecimento é possível identificar que o PVN e a LHA recebem estímulos anorexígenos e orexígenos e também desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase energética (SCHWARTZ *et al*, 2000).

#### **2.4.2. Comportamento alimentar hedônico**

A alimentação humana não se dá apenas por uma necessidade homeostática. Ela também acontece em momentos de saciedade e momentos em que o indivíduo possui alta reserva energética e de gordura, caracterizando, dessa forma, uma alimentação não-homeostática, a qual também é denominada de alimentação hedônica; ela pode ser produto de um fator compensatório, assim como um fator cognitivo e emocional (BERTHOUD, 2011). O consumo por motivação hedônica leva o indivíduo à ingestão na tentativa de obter prazer ou evitar o desprazer, independentemente do estado energético em que ele se encontra (AVENA, 2015).

O controle hedônico apresenta alguns componentes reguladores importantes, como o gostar e o querer. O gostar é regulado por áreas hedônicas no sistema mesocorticolímbico, capazes de amplificar o impacto hedônico dos sabores palatáveis, ou seja, o gostar diz respeito ao prazer associado ao alimento. Uma dessas áreas localiza-se no Núcleo Accumbens (NAc). O circuito mesocorticolímbico também pode gerar motivação, também denominado de desejo ou incentivo para obter e consumir recompensas alimentares. É o componente do querer (MORALES, 2020). O papel importante do NAc nesse controle será destacado a seguir.

## 2.5. Comportamento alimentar hedônico e o Núcleo Accumbens

A desregulação da dopamina no Núcleo Accumbens (NAc) é uma constatação recorrente em estudos que descrevem alterações anatomicamente específicas provocadas pelo abuso de substâncias (DI CHIARA, 1986; WISE, 1995). Alterações semelhantes foram descritas em estudos realizados utilizando oferta de alimentos palatáveis (AVENA, 2005; RADA, 2005). Isso levantou a questão de que, tanto as drogas quanto os alimentos palatáveis, poderiam agir através de vias neurais e mecanismos semelhantes.

Um dos mecanismos recentemente descritos inclui a estimulação de células GABAérgicas do NAc pela zona incerta, uma zona subtalâmica conhecida por receber informações sobre a distensão estomacal. Esta via GABAérgica estimula a função gástrica e a ingestão de alimentos através da sua ação sobre o NAc (WANG, 2020). Além disso, os sistemas glutamatérgico e endocanabinoide também parecem estar envolvidos nessa resposta. Um estudo realizado com ratos que sofreram mutação Glu-CB1 R-KO (*Knockout* para o receptor de canabinoide do tipo 1), descobriu que a falta de atividade do receptor CB1 tem um efeito excitatório sobre os neurônios glutamatérgicos na camada pré-límbica do córtex pré-frontal medial, o que, por sua vez, leva a um aumento do tônus glutamatérgico no NAc, com o consequente aumento da capacidade de se adaptar a comportamentos alimentares compulsivos (DOMINGO-RODRIGUEZ, 2020).

O Receptor 2 de Neuromedina U (NMUR2), um receptor de neuropeptídeos do SNC que está envolvido na regulação do comportamento alimentar, está também presente no NAc dos ratos, onde a sua densidade se correlaciona positivamente com a compulsão alimentar de preparações alimentares ricas em gordura (20% e 40%). Esta última está na faixa de alimentos normalmente consumidos em excesso pelos humanos (SMITH, 2019).

Em ratos portadores de estresse crônico, a expressão do receptor do CRF esteve hiper regulada tanto na área externa do NAc quanto interna do núcleo. Além disso, este mesmo estudo mostrou que os receptores D2 foram hiperregulados na parte interna do NAc de grupos com estresse crônico e hiporregulados na "casca" do NAc do grupo não estressado com compulsão alimentar. Esses resultados do receptor dopaminérgico foram acompanhados pelo receptor Mu Opióide. Foi

demonstrado aumento da expressão no "centro" do NAc de grupos estressados crônicos e a diminuição da expressão na área externa do NAc (WEI, 2019).

Além da ação de neuropeptídeos e neurotransmissores sobre o NAc, regiões encefálicas também influenciam a atividade do Núcleo. Uma dessas regiões é a Área Hipotalâmica Lateral (LH). Suas ações sobre o NAc incluem um aumento da expressão de c-Fos (um indicador de ativação neuronal) e da Orexin-A (um neuropeptídeo orexígeno) após a estimulação elétrica do LH e um aumento no consumo alimentar palatável semelhante ao que ocorre após a microinjeção de Orexina-A (LIU, 2020).

Portanto, considerando a participação dessa área na regulação do comportamento alimentar motivado por recompensa e que o estresse no início da vida pode alterar o comportamento alimentar hedônico, torna-se necessário investigar uma possível associação entre as alterações do comportamento alimentar e a atividade do Núcleo Accumbens em animais estressados no início da vida.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar os efeitos do estresse causado pela separação materna sobre o tamanho da refeição e a ativação neuronal do Núcleo Accumbens em ratos Wistar.

#### **3.2 Objetivo Específico**

Avaliar em ratos, aos 81 dias, submetidos ou não à separação materna:

- O tamanho da refeição (Kcal/Kg de peso corporal) com uma dieta palatável em resposta ao estresse alimentar;
- A ativação neuronal, em resposta ao estresse alimentar, pela expressão da proteína FOS no Núcleo Accumbens.

## **4. MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 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) já aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº0009/2018). Após adaptação foram realizados acasalamentos na proporção de duas fêmeas (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 à 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 22° 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.

### **4.2 Separação materna e formação dos grupos experimentais**

Os grupos experimentais foram delineados de acordo com a presença ou não da separação materna. Esta consistiu na separação entre mães e filhotes durante o período de 3 horas do segundo ao décimo quarto dia de vida. 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 (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 (SM) e

controle (C). 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 selecionados para a composição dos grupos experimentais.

### **4.3 Ingestão de alimento palatável após estresse alimentar**

Os animais, aos 60 dias de vida, foram submetidos ao estresse alimentar por 21 dias consecutivos. Este consistiu na exposição visual e olfativa do animal a um alimento palatável (Cookies de chocolate (Bauduco®) por vinte minutos. O alimento foi envolto em tela galvanizada (15cmx15cm), que não permitiu a alimentação do animal. Apenas no dia 81, após os vinte minutos de estresse, os animais tiveram acesso ao Cookies durante 1h. 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 à dieta padrão.

### **4.4 Tamanho da refeição**

Aos 81 dias de vida, após o estresse alimentar, foi permitida aos animais a ingestão por um período de 1h. Após isso, a quantidade rejeitada foi pesada e a ingestão foi dada pela diferença entre a quantidade ofertada e a quantidade rejeitada. O peso foi avaliado antes da ingestão. Com o peso e a quantidade ingerida, em calorias, foi feito o cálculo do tamanho da refeição (Kcal/Kg de peso), considerando que o Cookie possui 4,37 Kcal/g.

### **4.5 Eutanásia**

A eutanásia foi realizada por perfusão para retirada do encéfalo e análise da expressão da proteína FOS por imunohistoquímica. Ocorreu aos 81 dias de vida do animal.

#### 4.6 Perfusão

Os animais foram anestesiados com ketamina (60mg/kg de peso corporal) e xilazina (7,5 mg/kg de peso corporal). A perfusão foi realizada abrindo-se a cavidade torácica de maneira que expôs o coração permitindo o acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida a cânula para a perfusão. Afastando-se os pulmões, a aorta descendente foi pinçada impedindo, assim, que toda a sua área de irrigação fosse perfundida. A bomba peristáltica infundiu 150 ml de solução salina (NaCl, 0,9%) inicialmente à temperatura ambiente para remoção sanguínea dos vasos, evitando a formação de coágulos e proporcionando a correta penetração do fixador nos tecidos. Em seguida, foram infundidos 400 mL de solução fixadora (4% de paraformaldeído a 4° C). Ao final da perfusão os encéfalos fixados foram retirados do crânio e imersos na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (30%) durante 4 horas. Em seguida, foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio (PBS) e sacarose a (30%). Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criostato. Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placas de acrílico (24 poços) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C.

#### 4.7 Imunohistoquímica

Uma série de cortes foi submetida a reações de imunohistoquímica contra a proteína FOS. Nesse procedimento os cortes coronais da série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a três séries de lavagens. Na primeira foram lavados em PBS (3 x 10 min), na segunda com água oxigenada 0,6% (1 x 5 min) (para bloquear a atividade da peroxidase endógena e de alguns sítios inespecíficos de união ao anticorpo) e na terceira novamente em PBS (3 x 10 min) para remover os resíduos do pós fixador. Em seguida foram incubados em solução com anticorpo primário anti-FOS (feito em coelho) por 48 h. Esta solução é composta por PBS, Triton (0,3 %), soro normal de cabra (NGS 5%) e anticorpo contra a proteína FOS (1:10.000) (Calbiochem, Bad Soden, Alemanha). Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 ml posicionados em uma incubadora agitadora refrigerada (Marconi- MA83) protegido da luz. Após a incubação, os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e

posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário por 90 min. Esta solução foi composta por Triton (0,3%), PBS e anticorpo secundário biotilado feito em cabra contra coelho (1:200) (Sigma-B8895). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com PBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1% (Vectastain, Camon, Wiesbaden, Alemanha). Após esse período de incubação, os cortes foram lavados em PBS (2 x 10 min) e acetato de sódio (2 x 10 min) sendo, em seguida, realizada, durante 5 minutos, a reação de revelação imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637) diluída em solução de água destilada, níquel sulfato amônio (NAS), acetato de sódio (0.2 M), cloreto de amônio e  $\beta$ -d-Glicose. Após esta reação foi acrescentada na solução anterior a glicose oxidase até os cortes obterem a cor marrom claro/púrpura. Para neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com acetato de sódio (2 x 10 min) e PBS (3 x 10 min). Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, passaram por processos de desidratação e diafanização e foram, por fim, cobertos com lamínulas e DPX. No processo de desidratação ocorre imersão dos cortes em uma sequência crescente de concentrações de álcoois (50 %, 70 %, 95 %-I, 95 %-II - 3min em cada, 100 %-I, 100 %-II, 100 %-III - 5 min cada) seguido de diafanização em xilol (Xilo-I, 5 min, Xilol-II, 10 min). A área avaliada foi o Núcleo Accumbens. Esta foi identificada no microscópio óptico com auxílio do atlas estereotáxico Paxinos. A contagem de neurônios reativos para a proteína FOS foi feita manualmente através da ferramenta de contagem de células do programa image J.

#### **4.8 Estatística**

A comparação entre os diferentes grupos nos diferentes dias de estresse foi dada pelo teste t de Student admitindo-se um nível de confiança de 95%. A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism® (Graph Pad Software, Inc, 2007).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Tamanho da refeição

A separação materna diminuiu o tamanho da refeição com uma dieta palatável em comparação ao grupo controle. (C:  $355,9 \pm 29,9$  vs SM:  $316,9 \pm 38,6$ ,  $n=10-11$ ,  $p = 0,0175$ ) (Figura 1).

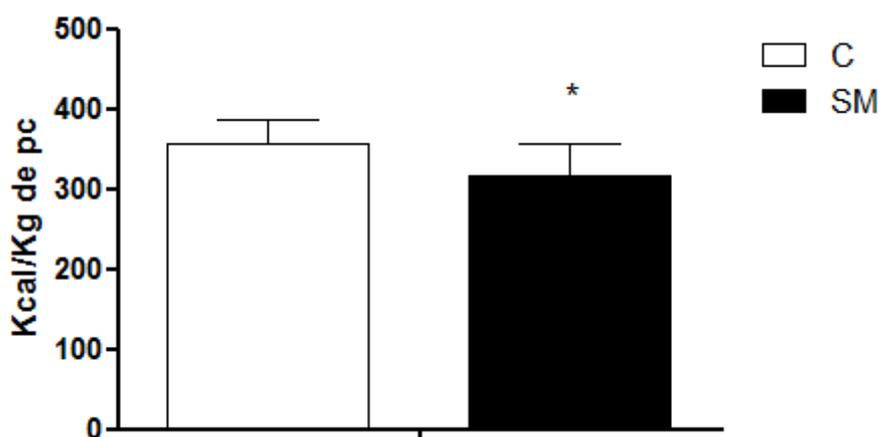


Figura 1. Efeitos da separação materna sobre o tamanho da refeição com alimento palatável (cookie) após estresse alimentar crônico. C: Controle. SM: Separação Materna. Teste t. Dados expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão da média. \*  $p = 0,0175$ .

### 5.2. Ativação neuronal no Núcleo Accumbens

A imunorreatividade da proteína FOS no núcleo accumbens apresentou-se semelhante entre os grupos analisados (C:  $3610,1 \pm 736,1$  vs SM:  $3295,4 \pm 748,5$ ,  $n=3-4$ ,  $p = 0,6$ ) (Figura 2).

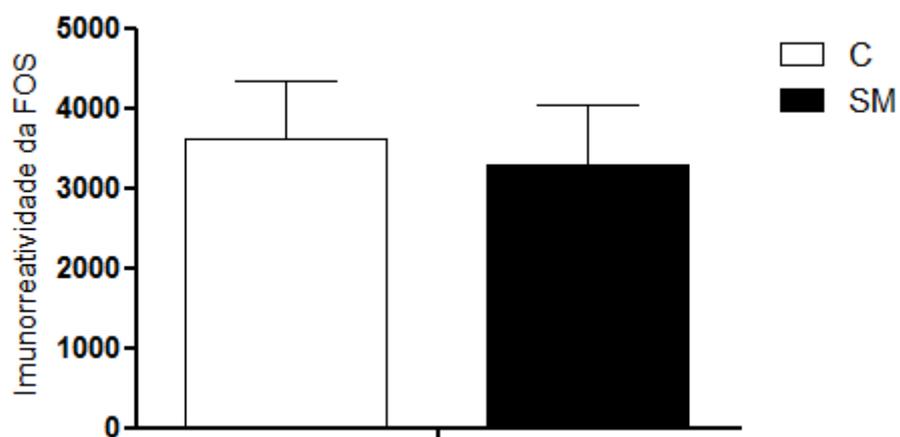


Figura 2. Efeito da separação materna sobre a imunorreatividade da proteína FOS no núcleo accumbens em resposta ao estresse crônico em ratos jovens. Teste t. n= 3-4. Dados expressos em média  $\pm$  Desvio padrão da média.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou que o tamanho da refeição utilizando-se uma dieta palatável, rica em carboidratos e gorduras, após submissão a um estresse crônico, é diminuído nos ratos que foram submetidos à separação materna nos primeiros 14 dias de vida, estressados crônicos. Essa alteração comportamental não foi acompanhada de alteração na ativação neuronal no Núcleo Accumbens nos animais separados.

Alguns estudos apresentam a relação da separação materna com a alteração na percepção do sabor doce, conferido pelo excesso de carboidratos, nos alimentos (MICHAELS e HOLTZMAN, 2007). Uma modificação nos receptores para este sabor específico, assim como uma alteração no limiar desta percepção podem justificar o resultado observado no presente trabalho. Nos estudos analisados, estes animais apenas dão preferência aos alimentos doces quando possuem um teor ainda mais elevado de sacarose (SCLAFANI, 2006). Isso leva a crer que o animal pode não preferir o alimento palatável por não ser capaz de discerni-lo como doce ou ainda por apresentar comportamento anedônico decorrente do estresse crônico causado pela separação materna.

A anedonia é um dos sintomas mais representativos em um quadro clínico de depressão e é caracterizada pela ausência do prazer em realizar atividades que são habitualmente prazerosas. Este comportamento pode ser também direcionado aos alimentos e caracterizar a rejeição ou diminuição do consumo de alimentos palatáveis. Quando há diminuição da ingestão, os animais são caracterizados como anedônicos, pois não apresentam o prazer natural com relação aos componentes recompensadores presentes nos alimentos (WIBORG, 2013). De fato, foi observado que a separação materna diminuiu expressivamente a ingestão de sacarose, a partir da avaliação semanal deste consumo. E mais, quando esses animais foram expostos ao estresse crônico imprevisível, essa anedonia foi mais acentuada. Portanto, o menor tamanho da refeição observado no presente estudo pode indicar que esses animais são anedônicos (DONOVAN, 2021).

Um ponto a ser destacado é que, neste trabalho, a separação materna somada ao estresse alimentar diminuiu o tamanho da refeição, medida em Kcal/Kg de peso. Outros estudos também têm demonstrado alterações do comportamento

alimentar como consequência da separação. Animais separados são hiperfágicos (RYU, 2009), apresentam saciedade antecipada (SILVA, 2014) e consomem mais dieta palatável (MANIAM, 2010). Contudo, ao nosso conhecimento, ainda não há dados sobre o efeito no tamanho da refeição (Kcal/Kg de peso corporal). A análise de calorias é essencial na análise das consequências sobre o comportamento alimentar porque, nem sempre, a ingestão em gramas se equipara àquela em calorias. Em estudo que avaliou a restrição calórica, foi observado que, na literatura, nem sempre estava claro se a restrição calórica envolvia a restrição concomitante da quantidade de alimentos consumidos. Para esclarecer isso, os pesquisadores submeteram camundongos a cinco intervenções dietéticas, variando entre dietas hiper ou hipocalóricas. Camundongos alimentados com dieta com a mesma quantidade de alimentos, mas com menos calorias, mostraram extensão máxima da vida útil e melhor saúde entre todos os grupos, sugerindo que a ingestão de calorias, em vez da quantidade de alimentos consumidos, é o fator chave para o efeito antienvhecimento da restrição calórica. De fato, com relação à separação materna, foi observado que a quantidade de alimentos ingeridos não foi diferente após estresse alimentar crônico (SOUZA, 2020). O presente estudo mostra, por outro lado, que embora possa não haver alteração na quantidade de alimentos ingeridos a quantidade de energia é menor. Portanto, este trabalho ressalta a importância das análises em calorias para a melhor compreensão dos efeitos de manipulações precoces sobre o consumo alimentar em longo prazo.

A resposta observada no tamanho da refeição em animais separados suscita uma análise sobre o efeito do estresse no comportamento alimentar. O estresse parece alterar a ingestão geral de alimentos, pelo menos, de duas formas, resultando em alimentação insuficiente ou excessiva. Essas respostas opostas são influenciadas pela gravidade do estressor e pelo tempo de exposição a ele. O estresse crônico, por exemplo, parece estar mais associado a uma maior preferência por alimentos ricos em energia e nutrientes, ou seja, aqueles que são ricos em açúcar e gordura (TORRES; CARYL, 2007). Esse padrão pode levar ao desenvolvimento de consequências deletérias decorrentes da hiperativação do eixo HPA (VARGA, 2013). Dentre as consequências estão, principalmente, a obesidade e suas co-morbidades associadas, como a hipertensão, a diabetes e a longo prazo. Nesse sentido, deveria ter sido observado um aumento do tamanho da refeição, o que não foi demonstrado no presente trabalho. Contudo, estudo anterior demonstrou

que esses animais, quando sob estresse agudo, e não crônico, ingerem menos alimento e, quando sob estresse crônico, ingerem mais alimento (SOUZA, 2020). Como, no presente estudo, não foi possível fazer a análise do estresse agudo, não se pode descartar a possibilidade do estresse crônico ter aumentado a ingestão comparado à situação sem estresse, e mais estudos são necessários, comparando as duas situações, para entender melhor o efeito do estresse no comportamento alimentar.

Com relação à expressão de FOS no NAc, não houve efeito da separação materna na ativação neuronal. Em humanos, tem sido demonstrado que o NAc está envolvido no controle da anedonia. Em indivíduos com depressão, patologia na qual a anedonia está presente, as respostas do NAc em antecipação a uma recompensa monetária foram diminuídas (SOUZA, 2020; GREEN, 2019). E mais, a recompensa musical também suscitou uma menor ativação neuronal no NAc nesses indivíduos (JENKINS, 2018). Em ratos, foi demonstrado que o estresse moderado causa alterações em vários neurotransmissores no NAc. Especificamente, em ratos anedônicos, houve aumento dos níveis de serotonina e diminuição dos níveis de glutamato (LI, 2022). Esses achados sugerem um papel do NAc na codificação de respostas recompensadoras e que a anedonia modifica essas respostas. No presente estudo, os animais parecem apresentar anedonia. No entanto, essa alteração comportamental não foi acompanhada pelas modificações esperadas no NAc. Um dos possíveis motivos para esse efeito pode ter sido a previsibilidade do estresse crônico. Os animais foram estressados durante 21 dias consecutivos. No estudo de Li et al., 2022, as alterações dos neurotransmissores foram induzidas por um estresse não previsível (LI, 2022). De fato, com o tempo, os animais parecem se adaptar ao estresse e as respostas observadas no início não são mais vistas posteriormente. Nesse sentido, a magnitude da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que ocorre em resposta a um estressor diminui com a exposição repetida a esse mesmo estressor. Esse declínio tem sido referido como “habituação” na literatura da neurobiologia do estresse (GRISSOM, 2009). Em outro estudo, avaliando os níveis de prolactina plasmática e AMPc na pituitária, foi demonstrado que as respostas a três estressores diferentes foram atenuadas em ratos que tiveram exposição prévia ao mesmo estressor em comparação com ratos que tiveram experiência anterior com um estressor diferente ou com nenhum agente estressor (JEAN KANT, 1985). Portanto, no presente estudo, a ausência de ativação

neuronal diferenciada nos animais separados quando comparada ao grupo controle pode ter sido devido a um processo de habituação ao estresse alimentar de 21 dias.

Além disso, não se pode descartar a possibilidade desses animais apresentarem alterações na ativação neuronal em outras áreas encefálicas. A dopamina liberada pelo mesencéfalo nas respostas a recompensas alimentares ou de outra natureza, além de agir no NAc também possuem como alvo regiões como o corpo estriado, a amígdala, o córtex pré-frontal e o córtex orbitofrontal. Ademais, a conexão entre neurotransmissores como a dopamina e a serotonina com essas estruturas cerebrais de recompensa desempenha um papel fundamental na regulação hedônica da ingestão de alimentos (CAMPOS, 2022). Sendo assim, são necessários estudos adicionais nessas outras regiões para entender os mecanismos por trás das alterações comportamentais observadas nos animais separados.

## 7. CONCLUSÃO

Portanto, o presente trabalho demonstrou que a separação materna no início da vida tem consequências sobre o comportamento alimentar na vida adulta, com diminuição do tamanho da refeição. Além disso, ressalta os efeitos da dupla exposição ao estresse em diferentes fases do desenvolvimento e, assim, reflete melhor o que acontece na realidade, em que diferentes estressores são experimentados ao longo da vida. Não foi demonstrada alteração na atividade neuronal que pudesse ser colocada como mecanismo subjacente à alteração comportamental. Ainda assim, sugere que outras áreas encefálicas podem estar envolvidas nos efeitos observados e abre a possibilidade para estudos futuros.

A partir do desenvolvimento do presente trabalho foi possível caracterizar os efeitos do estresse crônico, causado pela separação materna, no comportamento alimentar dos animais estudados. Diferentemente do que se acreditava na hipótese, não foi visualizada uma ativação neuronal especificamente no Núcleo Accumbens e foi visualizada uma redução no tamanho da refeição pelos animais. Este comportamento pode ser explicado pela alteração da percepção do paladar nos animais estressados crônicos, como também pode-se pautar na suposição de uma anedonia, também provocada por alterações decorrentes do estresse.

Os resultados obtidos nesta pesquisa afirmam a importância da ciência acerca do comportamento alimentar e sua determinação ainda nas fases iniciais da vida. Por isso, fornecem dados importantes para os profissionais que atuam na área da nutrição, pois demonstram que a vida precoce influencia a alimentação mais tarde na vida. Isso incentiva a prática da anamnese alimentar sobre os períodos neonatal, de lactação e primeira infância como abordagem na elaboração de planos alimentares. Além disso, os dados aqui produzidos podem ter impacto no desenvolvimento de iniciativas que visem promover o bom crescimento e desenvolvimento como estratégias de promoção da saúde mais tarde na vida.

## REFERÊNCIAS

AVENA N.M., LONG K.A., HOEBEL B.G. **Sugar-dependent rats show enhanced responding for sugar after abstinence: evidence of a sugar deprivation effect.** *Physiol Behav* 2005; 84(3): 359–62.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.12.016>>.

AVENA, N. **Hedonic Eating: How the Pleasure of Food Affects Our Brains and Behavior.** Oxford University Press; Oxford, UK: 2015. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=3PoJCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=oyPtGXgy\\_c&sig=3PPBfUJLMFif9uT8fj0hyKXkn9M&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=3PoJCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=oyPtGXgy_c&sig=3PPBfUJLMFif9uT8fj0hyKXkn9M&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)>.

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>>.

BERTHOUD, H-R. **“Metabolic and Hedonic Drives in the Neural Control of Appetite: Who Is the Boss?”.** *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 21, no 6, dezembro de 2011, p. 888–96. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.004>>.

BRAY, G. A., FISLER, J. & YORK, D. A. **Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models.** *Front. Neuroendocrinol.* 11, 128–181 (1990).

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>>.

CONE, R. et al. **The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation.** *Rec. Prog. Horm. Res.* 51, 287–318 (1996).

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>>.

DA SILVA, M. C., et al. **“Perinatal stress: characteristics and effects on adult eating behavior”**. Revista de Nutrição, vol. 26, no 4, agosto de 2013, p. 473–80. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-52732013000400009>>.

DOMINGO-RODRIGUEZ L., AZUA R., DOMINGUEZ E, et al. **A specific prelimbic-nucleus accumbens pathway controls resilience versus vulnerability to food addiction**. Nat Commun 2020; 11(1): 782.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14458-y>>.

DONOVAN, L., et al. **Maternal Separation Followed by Chronic Mild Stress in Adulthood Is Associated with Concerted Epigenetic Regulation of AP-1 Complex Genes**. Journal of Personalized Medicine, v.209, p.5, 2021.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jpm11030209>>.

DI CHIARA G., IMPERATO A. **Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats**. Ann N Y Acad Sci 1986; 473:367–81.  
Disponível em <<https://doi.org/10.1111/j.1749-632.1986.tb23629.x>>.

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>>.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. **Living with the past: evolution, development, and patterns of disease**. Science, v. 305, n. 5691, p. 1733-6, Sep 17 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375258>>.

GREEN I.W., PIZZAGALLI D.A., ADMON R., KUMAR P. **Anhedonia modulates the effects of positive mood induction on reward-related brain activation**. Neuroimage. 2019;193:115–125.

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>>.

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>>.

HILL, R. A., et al. **“Long-Term Effects of Combined Neonatal and Adolescent Stress on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Dopamine Receptor Expression in the Rat Forebrain”**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1842, no 11, novembro de 2014, p. 2126–35. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.08.009>>.

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>>.

HUSZAR, D. et al. **Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice**. *Cell* 88, 131– 141 (1997).

JENKINS L.M., et al. **Individuals with more severe depression fail to sustain nucleus accumbens activity to preferred music over time**. *Psychiatry Res. Neuroimaging*. 2018;275:21–27.

KOLB, BRYAN e GIBB, R. **“Brain Plasticity and Behaviour in the Developing Brain”**. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal De l’Academie Canadienne De Psychiatrie De L’enfant Et De L’adolescent*, vol. 20, no 4, novembro de 2011, p. 265–76.

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>>.

KOW, L. & PFAFF, D. **The effects of the TRH-metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding**. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 359–364 (1991).

KRISTENSEN, P. et al. **Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin**. *Nature* 393, 72– 76 (1998).

LEA, A. J. **Developmental plasticity: Bridging research in evolution and human health**. *Evol Med Public Health*, Published online, p. 162–175, 8 feb 2018.  
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5798083/>>.

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>>.

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

LI, Yan, et al. **“Neurotransmitter and Related Metabolic Profiling in the Nucleus Accumbens of Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Anhedonia-Like Rats”.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 16, abril de 2022, p. 862683. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.862683>>.

LIU X., GAO S., ZHANG N., et al. **The orexinergic neural pathway from the lateral hypothalamus to the nucleus accumbens and its regulation of palatable food intake.** *Neuropeptides* 2020; 80: 102028.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102028>>.

LUHESHI, G. **Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 7047–7052 (1999).

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>>.

MACEDO, I.C, FREITAS, J.S; TORRES, I.L.S. **The Influence of palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review.** *Advances in Pharmacological Sciences*, vol. 2016, 2016.

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>>.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. **Palatable cafeteria diet meliorates 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>>.

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>>.

MORALES, et al. **“Liking’ and ‘Wanting’ in Eating and Food Reward: Brain Mechanisms and Clinical Implications”**. Physiology & Behavior, vol. 227, dezembro de 2020, p. 113152. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113152>>.

MOUNTJOY, K., Mortrud, M., et al. **Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain.** Mol. Endocrinol. 8, 1298–1308 (1994).

PUDERBAUGH M., EMMADY P.D. **Neuroplasticidade.** StatPearls [Published online]. jan. 2022.  
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557811/>>.

RADA P., AVENA N.M., HOEBEL B.G. **Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell.** Neuroscience 2005; 134(3): 737–44.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.04.043>>.

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>>.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. **Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hypo-responsive 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>>.

SCHWARTZ, M., et al. **Controle do sistema nervoso central da ingestão de alimentos.** Nature 404 , 661-671 (2000).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/35007534>>.

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>>.

SHAHID, Z., et al. **“Physiology, Hypothalamus”**. StatPearls, StatPearls Publishing, 2022. PubMed.  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535380/>>

SMITH A.E., KASPER J.M., ANASTASIO N.C., HOMMEL J.D. **Binge-Type Eating in Rats is Facilitated by Neuromedin U Receptor 2 in the Nucleus Accumbens and Ventral Tegmental Area**. *Nutrients* 2019; 11(2).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu11020327>>.

SOUZA, F. L. **Efeitos do estresse por separação materna sobre o comportamento alimentar hedônico e sistema opioidérgico em ratos wistar jovens**. 2020. 59f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

SOUZA, J. A., et al. **“Dual Exposure to Stress in Different Stages of Development Affects Eating Behavior of Male Wistar Rats”**. *Physiology & Behavior*, vol. 214, fevereiro de 2020, p. 112769. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112769>>.

SOUZA, J. A., et al. **“Pre-Weaning Maternal Separation Increases Eating Later in Life in Male and Female Offspring, but Increases Brainstem Dopamine Receptor 1a and 2a Only in Males”**. *Appetite*, vol. 123, abril de 2018, p. 114–19. DOI.org (Crossref). Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.12.004>>.

TORRES, S. J., e CARYL A. N. **“Relationship between Stress, Eating Behavior, and Obesity”**. *Nutrition*, vol. 23, no 11–12, novembro de 2007, p. 887–94. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.08.008>>.

TSIGOS, C., et al. **Stress: Endocrine Physiology and Pathophysiology**. *Endotext*, edited by Kenneth R Feingold et. al., MDText.com, Inc., 17 October 2020.  
Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905226/>>.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. **Neural regulation of endocrine and autonomic stressresponses**. *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> >.

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.

VETULANI, J. **“Early Maternal Separation: A Rodent Model of Depression and a Prevailing Human Condition”**. *Pharmacological Reports*, vol. 65, no 6, novembro de 2013, p. 1451–61. DOI.org (Crossref).  
Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71505-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71505-6)>

VON BERNHARDI, R., BERNHARDI, L.Ev., EUGENÍN, J. **What Is neural Plasticity?. The Plastic Brain**. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol

1015. 28 oct. 2017.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_1)>.

WANG Q., ZHANG X., LENG H., et al. **Zona incerta projection neurons and GABAergic and GLP-1 mechanisms in the nucleus accumbens are involved in the control of gastric function and food intake.** *Neuropeptides* 2020; 80:102018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102018>>.

WEI N-L, QUAN Z-F, ZHAO T., et al. **Chronic stress increases susceptibility to food addiction by increasing the levels of DR2 and MOR in the nucleus accumbens.** *Neuropsychiatr Dis Treat* 2019; 15: 1211–29. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/NDT.S204818>>.

WIBORG, O. **Chronic mild stress for modeling anhedonia.** *Cell Tissue Res.* 2013, 354, 155–169.

WISE, R. A. **Dopamine, learning and motivation.** *Nature*, v.5 1-12, 2004.

WISE R.A., et al. **Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 1995; 120(1): 10–20. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/bf02246140>>.

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

ZARJEVSKI, N., et al. **Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity.** *Endocrinology* 133, 1753– 1758 (1993).