

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**VARIAÇÕES NO AMBIENTE NEONATAL
MODULAM O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E
AS RESPOSTAS NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS
PELA ABSTINÊNCIA AO ALIMENTO PALATÁVEL
EM RATAS FÊMEAS ADULTAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JULIANA BARCELLOS COLMAN

Porto Alegre, Brasil

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**VARIAÇÕES NO AMBIENTE NEONATAL
MODULAM O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E
AS RESPOSTAS NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS
PELA ABSTINÊNCIA AO ALIMENTO PALATÁVEL
EM RATAS FÊMEAS ADULTAS**

JULIANA BARCELLOS COLMAN

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Pelufo Silveira
Co-orientadora: Dr^a. Carla da Silva Benetti

Porto Alegre, Brasil

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Barcellos Colman, Juliana

Variações no ambiente neonatal modulam o comportamento alimentar e as respostas neuroquímicas induzidas pela abstinência ao alimento palatável em ratas fêmeas adultas / Juliana Barcellos Colman. -- 2014.

70 f.

Orientadora: Patrícia Pelufo Silveira.

Coorientadora: Carla Da Silva Benetti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Manipulação neonatal. 2. abstinência. 3. alimento palatável. 4. exposição crônica. I. Pelufo Silveira, Patrícia, orient. II. Da Silva Benetti, Carla, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

02 /04 /2014

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profa. Dra. Signorá Peres Konrad

Departamento Ciências da Saúde - Curso de Nutrição/ Universidade do Vale do Rio
dos Sinos - UNISINOS

Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Departamento de Farmacologia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte

Departamento de Pesquisa Experimental/PPGSCA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Dedico este trabalho ao meu pai Cléo e à minha mãe
Carmen, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao grupo DoHAD, em especial à minha orientadora Prof. Dra. Patrícia Pelufo Silveira e à minha Coorientadora, a Dra. Carla da Silva Benetti, que sempre estiveram me auxiliando durante a realização deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio, paciência e principalmente pelos ensinamentos e pelas palavras de conforto e incentivo no momento certo.

À equipe do DoHAD pelo auxílio e apoio. Sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA/HCPA) pelo apoio nos experimentos realizados.

Às pessoas que já não estão presentes na minha vida, mas que fizeram parte dela durante este trabalho e que me auxiliaram de inúmeras maneiras.

À minha família e amigos por entenderem minha ausência e me ajudarem nos momentos difíceis.

À Bia e ao Hegel, pela acolhida em Porto Alegre.

Ao meu irmão, Daniel, pelo auxílio com as caronas e desespero quando algo dava errado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pela oportunidade.

Ao CNPq, Capes e FIPE pelo apoio financeiro.

A todos que me auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: Variações das condições ambientais no período neonatal alteram a fisiologia e o desenvolvimento de diferentes sistemas. Modelos animais de estimulação neonatal induzem alterações neuroendócrinas e comportamentais persistentes. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da manipulação neonatal sobre o consumo de dieta palatável em diferentes períodos de exposição a esse tipo de alimento na vida adulta, e seus desfechos em resposta à abstinência ao alimento palatável. **Métodos:** No dia 0 de vida (dia de nascimento), as ninhadas foram divididas em manipuladas (M) e não manipuladas (NM), as que sofriram manipulação neonatal foram separadas das mães e colocadas em uma incubadora por 10 min/dia (do dia 1 ao dia 10 de vida). Aos 21 dias foi realizada a sexagem, apenas as fêmeas foram utilizadas neste trabalho. Entre os 80 e 100 dias de vida foram pesadas e randomizadas e o trabalho foi dividido em: Experimento 1 – exposição crônica à dieta palatável – comparação entre 15 dias e 30 dias de consumo da dieta e Experimento 2 – abstinência da dieta palatável – comparação de 24 horas e 7 dias de privação do alimento palatável com animais sem abstinência. A dieta foi oferecida a partir dos 90 dias de vida (todas as ratas tinham no mínimo 90 dias de vida). Foram avaliados: peso corporal, consumo alimentar, depósito de gordura abdominal (antes e depois da abstinência) e os níveis de corticosterona, de TH e p-CREB na amígdala após abstinência. As análises entre os grupos foram realizadas usando diferentes modelos estatísticos, ANOVA de duas vias, ANOVA de medidas repetidas seguidas pelo teste post-hoc de Tukey e o Teste t de *Student*. **Resultados:** Experimento 1 – Ambos os 15 e 30 dias de exposição crônica à dieta palatável induzem efeitos metabólicos semelhantes. Experimento 2- As ratas manipuladas no período neonatal mostram uma resposta peculiar à abstinência do alimento palatável após a exposição crônica dessa dieta por 15 dias, menor ingestão de alimento palatável após a retirada por 24 horas, acompanhado pelo aumento de TH e pCREB na amígdala. **Conclusões:** Este estudo sugere que as variações no ambiente neonatal podem afetar a resposta a abstinência aguda de dieta palatável, principalmente em um nível neuroquímico, aumentando o TH e presença de p-CREB na amígdala de indivíduos que sofreram manipulação neonatal e restrição de dieta palatável por 24 horas.

Palavras-chave: Manipulação neonatal, abstinência, alimento palatável, exposição crônica.

ABSTRACT

Introduction: Variations in environmental conditions in the neonatal period change the physiology and development of different systems. Animal models of neonatal stimulation induce neuroendocrine alterations and persistent behaviors. The objective of this research was to study the effects of neonatal handling on the consumption of palatable diet in different period of exposure to this type of food in adult life, and its outcome as a response to withdrawal to palatable food. **Methods:** On the day 0 of life (birth date), the offspring was divided into handled (H) and not handled (NH), the ones which underwent neonatal handling were separated from their mothers and put into an incubator for 10min/day (from day 1 to day 10 of life). By the age of 21 days a sexing was realized, only females were used in this research. Between the 80 and 100 days of life they were weighted and randomized and the study was divided into: Experiment 1- chronic exposure to palatable diet – comparison between 15 days and 30 days of diet consumption and Experiment 2 – withdrawal from palatable diet – comparison of 24 hours and 7 days of deprivation of palatable food on animals without withdrawal. The diet was offered from the 90th day of life on (all rats were at least 90 days of life). The following were evaluated: body weight, food consumption, abdominal fat deposit (before and after withdrawal) and the levels of corticosterone, TH and p-CREB of the amygdala after withdrawal. The analysis among the groups were carried out based on different statistic models, two-way ANOVA, repeated measures ANOVA followed by the Tukey post-hoc test and the Student's t-test. **Results:** Experiment 1- both 15 and 30 days of chronic exposure to palatable food induce comparable metabolic effects. Experiment 2 –rats handled during the neonatal period show a peculiar response to palatable food withdrawal after chronic exposure to this diet for 15 days, ingesting less of this food after 24h withdrawal, accompanied by increased amygdala TH and pCREB. **Conclusions:** This study suggests that variations in the neonatal environment may affect the response to acute withdrawal from palatable diet, mainly at a neurochemical level, increasing the TH and p-CREB presence in the amygdala of neonatally handled individuals that suffered such restriction for 24 hours of palatable food.

Keywords: Neonatal handling, withdrawal, palatable food, chronic exposure.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|--------------------------------------|
| Figura 1 - Linha de tempo 1: 15 dias de exposição à dieta palatável, seguidos de 24 horas e 7 dias de abstinência desse tipo de alimento | 34 |
| Figura 2 - Linha de tempo 2: 30 dias de exposição à dieta palatável, seguidos de 24 horas e 7 dias de abstinência desse tipo de alimento | 344 |
| Figura 3 - Manipulação neonatal | 35 |
| Figura 4 - Habituação ao alimento palatável na caixa-moradia..... | 366 |
| Figura 5 - Gráfico do consumo de alimento palatável durante a habituação.... | 43 |
| Figura 6 - Gráfico do consumo de alimento palatável no dia do teste após habituação..... | 44 |
| Figura 7 - Gráfico do consumo calórico de ração padrão durante 15 e 30 dias de exposição à dieta palatável | 466 |
| Figura 8 - Gráfico do consumo calórico de ração palatável durante 15 e 30 dias de exposição à dieta palatável | 488 |
| Figura 9 - Gráfico do peso corporal durante 30 dias de exposição à dieta palatável..... | 5150 |
| Figura 10 - Gráfico do depósito de gordura abdominal após 15 e 30 dias de exposição à dieta palatável | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 11 - Gráfico do consumo de alimento palatável- teste de comportamento alimentar conforme o tempo de abstinência à dieta palatável Erro! Indicador não definido. | 54 |
| Figura 12 – Gráfico da concentração de TH na amígdala de ratas sem abstinência, com abstinência 24 horas e com abstinência de 7 dias à dieta palatável..... | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 13 – Gráfico da concentração de pCREB na amígdalae ratas sem abstinência, com abstinência 24 horas e com abstinência de 7 dias à dieta palatável | Erro! Indicador não definido. |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Número de filhotes por ninhada e peso corporal antes da randomização nos diferentes períodos de exposição à dieta palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal..... | 42 |
| Tabela 2 - Delta do peso corporal e índice de preferência pelo alimento palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal, conforme o tempo de exposição à dieta palatável | 52 |
| Tabela 3 - Peso corporal, depósito de gordura abdominal e níveis de corticosterona no soro de ratas fêmeas manipuladas e não manipuladas no período neonatal após diferentes tempos de abstinência à dieta palatável ... | 566 |

LISTA DE ABREVIATURA OU SIGLAS

ACC - Accumbens

ACTH - Hormônio adrenocorticotrópico

CREB - cAMP response element-binding

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

DA - Dopamina

D1 - Receptor de dopamina

D2 - Receptor de dopamina

D3 - Receptor de dopamina

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DOHaD - Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença

GABA - Ácido gama- Aminobutírico

GAL - Neuropeptídeo galanina

GCs - Glicocorticóides

GLP – 1 - Glucagon - like peptide - 1

GPPG - Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HHA - Hipotálamo-hipófise-adrenal

HPA - Hipotálamo-hipófise-adrenal

IMC - Índice de Massa Corporal

OFC - Córtex Orbito Frontal

OMS - Organização Mundial da Saúde

RCIU - Restrição do crescimento intra-uterino

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

TH - Tirosina Hidroxilase

UEA - Unidade Experimental Animal

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 2.1 OBESIDADE – ADIÇÃO AO ALIMENTO PALATÁVEL? | 17 |
| 2.2 O AMBIENTE PERINATAL INFLUENCIA O CONSUMO DE ALIMENTOS PALATAVEIS? | 20 |
| 2.3 MECANISMOS NEUROQUÍMICOS RELACIONADOS À ABSTINÊNCIA AO ALIMENTO PALATÁVEL..... | 24 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 29 |
| 4 OBJETIVO GERAL | 30 |
| 5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 6 HIPÓTESE | 32 |
| 7 MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 7.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS..... | 33 |
| 7.2 MANIPULAÇÃO NEONATAL..... | 35 |
| 7.3 HABITUAÇÃO AO ALIMENTO PALATÁVEL | 355 |
| 7.4 EXPERIMENTO 1: EXPOSIÇÃO CRÔNICA À DIETA PALATÁVEL – COMPARAÇÃO ENTRE 15 DIAS E 30 DIAS DE CONSUMO DA DIETA | 366 |
| 7.5 EXPERIMENTO 2: ABSTINÊNCIA DA DIETA PALATÁVEL – COMPARAÇÃO ENTRE 24 HORAS E 7 DIAS DE PRIVAÇÃO DO ALIMENTO PALATÁVEL..... | 377 |
| 7.6 COLETA DE SORO E DISSECAÇÃO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS E DE TECIDOS | 38 |
| 7.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS | 388 |
| 7.8 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS | 39 |
| 7.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 40 |
| 7.10 ASPECTOS ÉTICOS..... | 400 |
| 8 RESULTADOS | 42 |
| 8.1 EXPERIMENTO 1 | 42 |
| 8.1.1 Números de filhotes por ninhada e peso aos 60 e 90 dias pós-natal | 42 |
| 8.1.2 Habituação ao alimento palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal | 43 |

| | |
|--|-------------|
| 8.1.3 Consumo calórico de ração padrão e palatável, durante 15 e 30 dias de exposição à dieta palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal | 44 |
| 8.1.4 Ganho de peso corporal e acúmulo de gordura abdominal em animais manipulados e não manipulados, no período neonatal, expostos por 15 e 30 dias à dieta palatável..... | 499 |
| 8.1.5 Comparação entre 15 e 30 dias de exposição crônica..... | 522 |
| 8.2 EXPERIMENTO 2 | 53 |
| 8.2.1 Avaliação do comportamento alimentar após 24 horas e 7 dias de abstinência à dieta palatável, em animais manipulados e não manipulados, no período neonatal, expostos a esse tipo de dieta por 15 dias na vida adulta. | 53 |
| 8.2.2 Avaliação do peso corporal, do acúmulo de gordura abdominal e níveis de corticosterona no soro após 24 horas e 7 dias de abstinência à dieta palatável, em animais manipulados e não-manipulados, no período neonatal, expostos a esse tipo de dieta por 15 dias na vida adulta. | 55 |
| 8.2.3 Análises neuroquímicas após 24 horas e 7 dias de abstinência à dieta palatável, em animais manipulados e não manipulados, no período neonatal, expostos a esse tipo de dieta por 15 dias na vida adulta. | 56 |
| 8.2.3.1 Concentração de tirosina hidroxilase (th) na amígdala de ratas manipuladas e não manipuladas, expostas por 15 dias à dieta palatável, após 24 horas e 7 dias de privação desse tipo de dieta. | 566 |
| 8.2.3.2 Concentração de p-CREB na amígdala de ratas manipuladas e não manipuladas, expostas por 15 dias à dieta palatável, após 24 horas e 7 dias de privação desse tipo de dieta..... | 5857 |
| 9 DISCUSSÃO | 600 |
| 10 CONCLUSÃO | 66 |
| REFERÊNCIAS..... | 67 |

1 INTRODUÇÃO

Há muitos anos, estudos têm descrito o impacto das condições ambientais existentes no período neonatal sobre o padrão de saúde e doença de indivíduos ao longo da vida. A literatura científica tem destacado que o efeito desses estímulos altera a fisiologia e o desenvolvimento de diferentes sistemas, como o do sistema endócrino-metabólico (SOTO et al., 2003). Investigações utilizando modelos animais apontam que alterações neuroendócrinas, bem como alterações comportamentais induzidas pela estimulação neonatal, tendem a perdurar por toda a vida (FRANCIS et al., 1996).

Nos estudos experimentais, um dos modelos adotados para estudar essa influência do ambiente nos primeiros dias de vida é a manipulação neonatal (Levine et al., 1967), que serve como um instrumento para avaliar a fisiologia e os efeitos de uma experiência neonatal particular (LUCION et al., 2003; PANAGIOTAROPOULOS et al., 2004; MEANEY et al., 1989). Quando adultos, os animais manipulados demonstram uma menor resposta comportamental de medo, além de serem mais ativos e exploradores quando expostos a um ambiente novo em comparação com os animais não manipulados (LEVINE et al., 1967). A manipulação neonatal também reduz a resposta a situações de estresse agudo e crônico (LEVINE et al., 1967; ADER; GROTA, 1969; PADOIN et al., 2001; PANAGIOTAROPOULOS et al., 2004, SILVEIRA et al. 2011) e induz uma retroalimentação negativa dos Glicocorticóides (GCs) mais eficiente no hipocampo (ADER; GROTA, 1969; MEANEY et al; 1989).

Além de ser um modelo clássico de programação persistente da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) pelo ambiente precoce (ADER; GROTA 1969; PLOTSKY; MEANEY, 1992; MEANEY et al., 1989), a manipulação neonatal aumenta o consumo de alimentos palatáveis (SILVEIRA et al., 2004), reduz os níveis de grelina no plasma (SILVEIRA et al; 2006), o metabolismo dopaminérgico (SILVEIRA et al., 2010) e os receptores de dopamina (D3) no núcleo accumbens de ratos adultos (BRAKE et al; 2004). Embora esses animais apresentem um aumento no consumo de alimentos palatáveis, ricos em açúcar e gordura, na vida adulta (SILVEIRA et al.; 2004;

BENETTI et al.; 2007), nosso grupo observou que animais manipulados no período neonatal e cronicamente expostos ao chocolate, quando adultos, apresentam maior eficiência calórica, menores níveis de triglicerídeos (machos) e menor acúmulo de gordura abdominal em relação aos controles (fêmeas) (BENETTI et al., 2007). Após um período de exposição crônica e retirada abrupta do alimento palatável, animais manipulados apresentam menos respostas comportamentais relacionadas à abstinência em relação aos controles (BENETTI et al., 2010), porém com maior perda de peso em 24h após a retirada e maior consumo rebote do alimento palatável após 7 dias de abstinência em relação aos controles (BENETTI et al., 2013). Portanto, esta intervenção neonatal altera a resposta comportamental à abstinência do alimento palatável após um período de exposição crônica, porém os mecanismos centrais envolvidos nesta diferença não são conhecidos.

Considerando que o consumo deliberado de alimentos palatáveis está associado à obesidade e pode ser considerado como viciante (VOLKOW et al., 2013), o conhecimento sobre os mecanismos que afetam este consumo são importantes para a identificação de possíveis populações vulneráveis em humanos. Logo, este trabalho se propõe a estudar mais detalhadamente como a vida neonatal modula a resposta comportamental à retirada do alimento palatável oferecido de forma crônica, assim como os potenciais mecanismos envolvidos nessa resposta, em ratas fêmeas adultas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OBESIDADE – ADIÇÃO AO ALIMENTO PALATÁVEL?

A obesidade é considerada uma epidemia mundial, de modo que, a cada ano, 2,6 milhões de pessoas morrem em decorrência da doença. Antigamente considerada uma enfermidade de alta prevalência apenas em países ricos, atualmente atinge países de média e baixa renda (www.who.int/en/, 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um bilhão de adultos sofre com sobrepeso e 300 milhões de pessoas são obesas no mundo (www.who.int/en/, 2014). Se não houver uma mudança, a OMS estima que cerca de 1,5 bilhão de pessoas no mundo serão acometidas pelo sobrepeso em 2015 (www.who.int/en/, 2014). Considerada um dos problemas mais graves de saúde pública atuais, a obesidade infantil preocupa pelo fato de que crianças obesas ou com sobrepeso tendem a se tornar adultos obesos, podendo sofrer cronicamente com as morbidades associadas à obesidade e/ou ter uma morte prematura (www.who.int/en/, 2014). Estima-se que existam no mundo, hoje, cerca de 42 milhões de crianças menores de 5 anos obesas ou com sobrepeso (www.who.int/en/, 2014). A OMS ainda alerta que o sobrepeso e a obesidade nos dias de hoje matam mais do que o baixo peso, e que 65% da população vive em países onde isto ocorre (www.who.int/en/, 2014).

Formas diferentes de obesidade e transtornos alimentares são neuroquímica e comportamentalmente semelhantes ao vício em drogas, podendo ser conceituadas como condições crônicas recorrentes que alternam períodos de abstinência (fazer dieta e evitar o “proibido” alimento palatável) e compulsão (o comer compulsivo, muitas vezes incontrolável, ingerindo-se alimentos ricos em açúcar e gordura), que continuam apesar das consequências (COTTONE et al., 2009). Através do repetido acesso a alimentos altamente saborosos, alguns indivíduos (seres humanos e animais de laboratório) podem eventualmente substituir os processos inibitórios que sinalizam a saciedade e compulsivamente consumir grandes quantidades de alimentos, apesar de uma sobrecarga nutricional e até uma repulsa a esse comportamento, no caso dos seres humanos. Essa perda do controle, com consequente consumo compulsivo de alimentos, é um comportamento

comparável ao uso de drogas ilícitas, em que esses padrões são observados na dependência química. Nesse sentido, sugere-se que a obesidade possa ser vista como uma forma de “vício em comida” (DILEONE et al., 2012; VOLKOW, 2013).

Nosso organismo sobrevive por meio da manutenção da homeostase energética, que é regulada por mecanismos complexos e pela interação de diferentes estruturas e sistemas (como o Sistema Nervoso Central, o Sistema Digestivo e o tecido adiposo). Entretanto, comportamentos alimentares também são influenciados por outro nível de regulação, que envolve o processamento de sensações de prazer e recompensas por meio de sinalização neuroquímica de vários neurotransmissores, como a dopamina (DA) e os opióides, e a capacidade do organismo de ser condicionado à presença de estímulos alimentares prazerosos que, em seguida, irão desencadear o desejo pela comida (VOLKOW, 2013).

Já ao pensarmos no consumo alimentar, em termos evolutivos, quando ocorria escassez de comida, o alimento palatável (rico em açúcar e gordura) era vantajoso, pois o organismo armazenava energia para futuras ocasiões. Entretanto, em uma sociedade como a atual, onde há fartura dos alimentos altamente calóricos e nem sempre nutricionalmente ricos, esta adaptação torna-se perigosa (VOLKOW et al., 2013). Ligados a este consumo de alimentos palatáveis, temos envolvidos inúmeros neurotransmissores, incluindo a dopamina, canabinóides, opióides, ácido gama- Aminobutírico (GABA) e a serotonina, assim como hormônios e neuropeptídeos estão presentes nessa regulação homeostática da ingestão de alimentos, como a insulina, orexina, leptina, grelina, PYY, glucagon - like peptide - 1 (GLP-1). Esses neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos têm sido implicados nos efeitos associados à recompensa de alimentos e/ ou drogas (VOLKOW et al., 2013). Colaborando com isso, em um estudo de Bluml et al. (2012) relata uma relação inversa entre o índice de massa corporal (IMC) e uso recente de drogas ilícitas, tendo uma associação entre obesidade e um risco menor de transtornos por uso dessas substâncias (SIMON et al 2006). Isso sugere uma possível disputa entre as vias associadas à recompensa, pois de uma forma inversa, quando há recompensa através de alimentos, não existe necessidade da sensação de prazer obtida através da utilização de drogas ilícitas. Ainda

acrescido a estes achados, sabe-se que os indivíduos obesos apresentam taxas mais baixas de abuso de nicotina e de maconha do que os indivíduos não obesos (VOLKOW et al., 2012). De acordo com Davis et al.(2010), outros estudos mostram que intervenções que diminuem o IMC e reduzem os níveis plasmáticos de insulina e leptina aumentam a sensibilidade a drogas psicoestimulantes. Em adição a estes relatos, outros achados revelam associações entre mudanças neuroendócrinas e hormonais ocasionadas pela insulina, leptina e grelina que são desencadeadas através da restrição alimentar e demonstradas pela sinalização das vias dopaminérgicas (THANOS et al., 2008; DUNN et al., 2012). A partir destas sinalizações, se descreve uma relação entre a personalidade viciante, a má adaptação alimentar e o consumo de álcool, após a cirurgia bariátrica, comprometendo os comportamentos alimentares e de dependência do álcool (LENT MR; SWENCIONIS C., 2012; KING et al.,2012). Após essas evidências, reforça-se o questionamento sobre a possibilidade de uma competição entre alimentos e drogas pelos mecanismos de recompensa envolvidos no processamento desses estímulos.

Sendo a obesidade considerada um vício semelhante à dependência química e tida como um transtorno alimentar, assim como a anorexia e a bulimia nervosa, pode apresentar traços pré-mórbidos, como o perfeccionismo e a ansiedade. Esses elementos tornam os indivíduos vulneráveis a utilizar extremos de ingestão de alimentos como uma forma de reduzir as sensações desagradáveis (recompensa) e a desregulação dentro ou entre o circuito límbico e corticostriatal contribui para esses sintomas (KAYE et al., 2013).

Apesar de o alimento poder ser considerado uma “droga”, é importante ressaltar que existem características individuais que conferem vulnerabilidade aos efeitos ocasionados pela dieta rica em açúcar e gordura, como alterações genéticas (SILVEIRA et al., 2014) e metabólicas (DALLMAN et al., 2005). Estudos realizados nos últimos anos apontam a ideia de que a qualidade do ambiente fetal/neonatal programa as preferências alimentares, influenciando as escolhas alimentares persistentemente durante a vida adulta (PORTELLA et al., 2012). Além disso, pesquisas com animais descrevem que o consumo de alimentos altamente calóricos, ricos em açúcar e gordura, provoca uma redução na resposta do eixo hipotálamo pituitária-adrenal (HPA) ao estresse (PECORARO et al., 2004), indicando um efeito metabólico-periférico da dieta

palatável sobre o cérebro (DALLMAN et al., 2003), de modo que este tipo de alimento é chamado de “*comfort food*”.

2.2 O AMBIENTE PERINATAL INFLUENCIA O CONSUMO DE ALIMENTOS PALATAVEIS?

Estudos que consideram a linha DOHaD (conceito de Origens Desenvolvimentistas da Saúde do Adulto), consoante Silveira et al. (2007), sugerem que variações do ambiente perinatal, principalmente no período intra-útero, podem ocasionar mudanças permanentes na fisiologia e no metabolismo de um indivíduo até a sua vida adulta, aumentando o risco de doenças crônicas não transmissíveis (INADERA, 2013). Estudos observacionais e experimentais têm ligado exposições adversas no início da vida, especialmente em relação à nutrição, à suscetibilidade a doenças crônicas na idade adulta (BRENSKE B. et al, 2013). Essa exposição, no início da vida, a uma ampla rede de insultos tem um impacto muito grande sobre as causas dos distúrbios metabólicos. Estes fatores podem afetar processos epigenéticos, como a metilação do DNA, permitindo o desenvolvimento influenciado pelo ambiente na modulação e transcrição de genes (INADERA, 2013).

Um dos mecanismos propostos para explicar a programação do maior risco para doenças metabólicas é que variações do ambiente perinatal afetam o funcionamento de alguns sistemas, persistentemente, como é o caso do eixo HPA (LIU et al., 1997). O eixo hipotálamo hipófise adrenal desempenha uma função fundamental na resposta aos estímulos externos e internos, incluindo os estressores psicológicos (TSIGOS, 2002).

O eixo HPA é um dos mecanismos responsáveis pelas respostas fisiológicas ao estresse. A submissão a ambientes estressores induz ao livramento do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina pelo hipotálamo, os quais ativam a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, que é solto na corrente sanguínea e estimula a secreção de glicocorticoides pelo córtex adrenal (NEMEROFF CB.,1996). A regulação do eixo hipotálamo hipófise adrenal se dá sob a influência de diversos fatores, principalmente pela retroalimentação negativa dos glicocorticoides no sistema nervoso central (ADER; GROTA, 1969; MEANEY et al; 1989). Alguns estudos

evidenciam a inervação catecolaminérgica, serotoninérgica e dopaminérgica direta nos neurônios produtores de CRH no hipotálamo; esses e outros neurotransmissores parecem influenciar a liberação de CRH (JURUENA et al., 2004).

Os glicocorticoides são produtos finais do eixo HPA e participam do controle da homeostase do organismo inteiro e da resposta do organismo ao estresse. Eles possuem um papel regulador sobre a atividade basal do eixo HPA e sobre a extinção da resposta ao estresse, agindo no hipocampo, no hipotálamo e na hipófise.

Os glicocorticoides também afetam a preferência alimentar por alimentos altamente palatáveis. Por esse motivo, nosso grupo vem estudando se variações no início da vida (que modificam de forma persistente a função do eixo HPA) afetam também de forma permanente o consumo de alimentos palatáveis e a resposta neuroquímica a este tipo de alimento (ADER; GROTA, 1969; PLOTSKY; MEANEY, 1992; MEANEY et al., 1989).

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que a alimentação pode ser alterada por variações no ambiente neonatal precoce, assim como a programação da preferência alimentar ao longo da vida. No Brasil, foi demonstrado que mulheres que sofreram restrição de crescimento intrauterino (RCIU) apresentam maior preferência por carboidratos aos 24 anos de idade, possivelmente contribuindo para o risco de doenças metabólicas desta população (BARBIERI et al., 2009). Em outro estudo realizado no Canadá, foi observado que as meninas com 3 anos de idade e com peso normal ao nascer têm maior capacidade de adiar recompensas alimentares do que os meninos; entretanto, entre as crianças nascidas com RCIU, não há esta diferença entre os sexos. Além disso, nessas meninas, a maior impulsividade frente à recompensa doce prediz tanto um maior consumo de alimentos com alto teor de gordura (alimentos palatáveis) quanto maior índice de massa corporal (IMC) no ano seguinte. Esses resultados sugerem que, nas meninas, a qualidade do crescimento fetal pode influenciar o comer compulsivo, promovendo, assim, um aumento de consumo de gorduras e de IMC mais alto (SILVEIRA, 2012), e,

possivelmente, facilitando maiores riscos para doenças crônicas na vida adulta.

Ainda reforçando o conceito da influência do ambiente intrauterino na vida adulta, e suas preferências alimentares, de acordo com Ayres et al. (2012), quanto mais intenso a RCIU menor será a frequência da resposta hedônica observada ao nascer, indicando que RCIU está associada a uma diminuição da sensibilidade à sensação de prazer gerada pelo doce, provavelmente levando ao consumo excessivo de alimentos palatáveis ao tentar aumentar a sensação de prazer (recompensa).

Diante dessas evidências, tem-se o conhecimento de que a qualidade do ambiente intrauterino afeta o desenvolvimento das preferências alimentares ao longo da vida, estando associada ao maior consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura e, com isso, diminuindo a ingestão de frutas e verduras. Isso proporciona um risco maior para o desenvolvimento de doenças como: obesidade, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão arterial e síndrome metabólica (SILVEIRA et al., 2014).

Além disso, inúmeros modelos animais têm sido propostos para investigar estas associações, entre eles a manipulação neonatal. Esta intervenção é um modelo relevante, pois envolve a programação do eixo HPA através da breve separação dos filhotes de sua mãe nos primeiros dias de vida, aumentando o cuidado materno (LIU et al., 1997) e modificando a expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo através de mecanismos epigenéticos (MEANEY et al., 2005). Estas modificações persistentes são acompanhadas de uma série de alterações comportamentais na vida adulta: esses animais apresentam menor medo, maior exploração quando expostos a um ambiente novo e menor neofobia frente a um alimento novo (CALDJI et al., 1998).

Estudos utilizando este modelo observaram um aumento do consumo de alimentos palatáveis na vida adulta destes animais (SILVEIRA et al., 2004, 2005, 2006, 2008, 2010, 2011). Além disso, quando expostos de forma crônica ao alimento palatável (chocolate), conforme Benetti et al. (2007), animais manipulados no período neonatal consumiram mais alimento palatável em comparação aos controles e os machos manipulados apresentaram maior peso

corporal e maior eficiência calórica, com níveis de triglicerídeos mais baixos. Já as fêmeas manipuladas expostas cronicamente ao chocolate apresentam menor deposição de gordura abdominal em comparação com as fêmeas não manipuladas no período neonatal, sugerindo um padrão metabólico específico; embora a manipulação neonatal possa reduzir o risco de síndrome metabólica na idade adulta, os efeitos dessa intervenção podem ser dependentes do gênero (BENETTI et al., 2007). Outro estudo descreveu que a saciedade em animais manipulados é diferentemente induzida após o uso de vários tipos de alimentos, e inclusive após consumo prévio de uma solução de sacarose, e demonstrou que a grelina plasmática é diminuída nesse grupo em relação aos controles (SILVEIRA et al., 2006). Essa diminuição nos níveis de grelina poderia sugerir que os mecanismos de sinalização relacionados com a saciedade, tanto periférica quanto central, podem contribuir para os comportamentos alimentares típicos destes animais (SILVEIRA et al., 2006). Da mesma forma, Da Benetti et al. (2007) demonstrou que o ambiente precoce influencia a resposta metabólica, afetando a deposição de gordura abdominal em ratas fêmeas adultas expostas a uma dieta altamente calórica.

Num estudo subsequente, também realizado pelo nosso grupo, foram observados os efeitos da exposição crônica, na idade adulta, a uma dieta altamente palatável (chocolate) sobre a atividade no cérebro, de Na^+ , K^+ -ATPase e sobre concentrações da proteína de S100B, no basal e em resposta à retirada desta dieta palatável (abstinência). Verificou-se que, em animais manipulados no período neonatal, o consumo crônico de chocolate não diminuiu Na^+ , K^+ -ATPase tanto na amígdala quanto no hipocampo, ao contrário do encontrado nos controles (não manipulados no período neonatal). Essa diferença - diminuição de Na^+ , K^+ -ATPase -, no entanto, desapareceu após a retirada do chocolate, o que sugere que os animais manipulados no período neonatal são menos suscetíveis aos efeitos da exposição crônica ao chocolate (e posteriormente sua retirada) e que a manipulação neonatal pode reduzir ou impedir os efeitos de alterações induzidas por um longo prazo de exposição a uma dieta altamente palatável. Isso diminuiria a vulnerabilidade das alterações metabólicas e neurais (BENETTI et al., 2010). A partir dessas evidências, pode-se acreditar em um provável efeito protetor desencadeado pela manipulação no período neonatal.

2.3 MECANISMOS NEUROQUÍMICOS RELACIONADOS À ABSTINÊNCIA AO ALIMENTO PALATÁVEL

As modificações neuroquímicas em sistemas neurotransmissores envolvidas no comportamento alimentar e na recompensa são causadas pelo consumo de alimentos ricos em gordura e açúcar (LEVINE et al., 2003). A regulação dos comportamentos alimentares e a resposta ao alimento são moduladas por inúmeros mecanismos periféricos e centrais que direta ou indiretamente transitam pelas vias cerebrais de recompensa (VOLKOW et al., 2013).

A partir disso, sabe-se que inúmeras interações moleculares e funcionais estão envolvidas na homeostase energética e na influência das vias dopaminérgicas sobre a sensação de recompensa, de modo que diversos hormônios e peptídeos também podem influenciar essas respostas à recompensa durante utilização de drogas (glucagon-like peptide-1, insulina, grelina, leptina, orexina e receptores de melanocortina) (VOLKOW et al., 2013). Reforçando o papel da influência de hormônios na resposta à recompensa, Pankevich et al. (2010) encontrou concentrações de hormônio de melanina e orexina elevadas após uma dieta rica em gordura em camundongos previamente restritos. Além disso, Avena (2009) sugere que a falta dos sinais associados à abstinência de opiáceos e a compulsão por alimentos ricos em gordura em ratos pode ser causada pela ativação endógena do neuropeptídeo galanina (GAL), induzida pela gordura, assim inibindo os efeitos relevantes dos opióides. Essas interações podem ajudar a explicar a diminuição da busca por drogas (recompensa) em animais obesos (DAVIS et al., 2008).

Volkow et al. (2007, 2013) sugerem, através de achados de diversos estudos, que alimentos e drogas possam competir pelos mecanismos de recompensa que se sobrepõem, como vimos acima. Ainda esclarecendo a importância do papel da dopamina nos comportamentos emocionais e motivacionais, sabe-se que eles são regulados por ela (DA) através da via dopaminérgica mesolímbica e que alterações na neurotransmissão do sistema mesolímbico dopaminérgico podem modificar as respostas comportamentais a vários estímulos ambientais associados aos comportamentos de recompensa, como o de psicoestimulantes, drogas de abuso, assim como os associados aos

alimentos, podendo causar modificações sinápticas substanciais ao sistema mesolímbico dopaminérgico (BAIK, 2013).

Além dos neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico modularem a motivação e as respostas comportamentais à recompensa, também estão associados ao esforço necessário para sobreviver, considerando que uma deficiência no funcionamento desses neurônios pode ocasionar uma diminuição na motivação do consumo de alimentos, resultando em morte (VOLKOW et al., 2013). Somando a isso, um estudo realizado com camundongos geneticamente modificados, que não possuíam tirosina hidroxilase em todos os neurônios dopaminérgicos, morriam de fome com 4 semanas de idade. Entretanto, após receberem tratamento diário com L-Dopa, os camundongos modificaram o comportamento alimentar, voltando a comer (PALMITER, 2008).

Dentre os sinais associados ao consumo de drogas e alimentos, a dopamina é o mais investigado; ela sinaliza, através de seus receptores D1 e D2 no estriado, a necessidade de alimentação e outros comportamentos alimentares relacionados. Após a retirada do alimento ou droga oferecido de forma crônica, o comportamento para o consumo dos mesmos pode ser desencadeado pela re-exposição, condicionamento ou por exposição a um fator estressor. Alterações na sinalização dos receptores de dopamina D1 (elevado) e D2 (diminuído) estão relacionadas ao consumo compulsivo por drogas, sugerindo que essa alteração pode desencadear uma ingestão compulsiva de alimentos (VOLKOW et al., 2013).

O impulso pelo consumo de drogas não envolve apenas o circuito mesocorticolímbico, mas também outros, incluindo controle inibitório, humor, respostas ao estresse e memória (VOLKOW et al., 2013). A ingestão dos alimentos altamente palatáveis libera alta quantidade de DA no estriado, ativando o circuito de recompensa. A diminuição da atividade dopaminérgica pode elevar o consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura como um mecanismo compensatório, proporcionando, assim, a resposta embotada do circuito de recompensa (VOLKOW et al., 2013). Adicionado a isso, o estudo de Palmiter (2008) relata que os camundongos que receberam tratamento com L-Dopa (que não apresentavam presença de tirosina hidroxilase nos neurônios dopaminérgicos) ainda tinham preferência por alimentos doces. Também estão

envolvidos nas respostas condicionadas a alimentação e consumo de drogas: a amígdala, córtex orbito frontal (OFC), hipocampo, e ínsula, de forma que, quando ocorre a inibição do desejo pela droga ou alimento palatável, ocorre uma diminuição de suas atividades. Assim sendo, de acordo com Volkow et al. (2013), disfunções de OFC estão associadas a transtornos alimentares.

Reforçando a importância da dopamina nos comportamentos alimentares, a diminuição da sinalização de DA estriatal pode ocasionar a perda do auto-controle e a regulação negativa de D2R, que modula as regiões frontocorticais e aumenta a sensibilidade às drogas (aumentando a sensibilidade à recompensa), já a regulação positiva do D2R influi no consumo das mesmas. Essa desregulação na sinalização do D2R talvez possa influenciar na obesidade e no consumo alimentar compulsivo. A redução do D2R estriatal no vício e na obesidade é associada à diminuição de atividades nas regiões pré-frontais OFC e ACC, ou seja, sua desregulação mediada pela sinalização de DA nessas regiões, em usuários de drogas e obesos, poderia incentivar o consumo de drogas ou alimentos (VOLKOW et al., 2013). Além do envolvimento das vias dopaminérgicas nas vias de recompensa, de acordo com Pankevich (2010), a realização de uma restrição calórica promoveria alterações de longo prazo em genes importantes relacionados aos circuitos de alimentação e recompensa, essa restrição também influenciaria na ingestão de alimentos e nos comportamentos relacionados ao estresse. Essas alterações poderiam ser conduzidas por mecanismos epigenéticos, que promoveriam um aumento na sensibilidade das vias de estresse que se projetariam para alterar circuito de recompensa (PANKEVICH et al., 2010).

Koob e Le Moal (2005) sugerem que os indivíduos utilizam a droga ou o alimento palatável como forma de amenizar estados de espírito negativos, como estresse, ansiedade e depressão, destacando a importância dos circuitos cerebrais que modulam as reações ao estresse. A ideia central desses autores é: uma maior sensibilidade da amígdala e o aumento da sinalização através do fator liberador de corticotrofina e peptídeos relacionados, que medeiam as respostas ao estresse. O núcleo central da amígdala desempenha um papel importante no fenômeno de ansiedade e também nos comportamentos motivacionais do consumo de álcool e alimentos palatáveis (PANDEY et al., 1999b). Com isso, Pandey et al. (1999b) frisa o envolvimento e a importância

da concentração de p-CREB na amígdala, nos processos de recompensa, o que sugere que sua diminuição pode aumentar a preferência por bebidas alcoólicas. Também sugere que a função diminuída de CREB na amígdala pode estar associada à manutenção e ao aumento da ansiedade com a preferência por álcool.

Em outro estudo, foi encontrada a diminuição de CREB e p-CREB na amígdala central e basolateral de ratos normais através de infusão bilateral de PKA - inibidor (Rp cAMPS) e, em seguida, foram medidos os níveis de ansiedade e de preferência por álcool nestes animais. Os resultados sugerem que a retirada do etanol, após 15 dias de tratamento essa substância orgânica, pode estar associada à diminuição da fosforilação de CREB na amígdala central e medial (PANDEY et al., 2003).

Relacionada aos mecanismos envolvidos nas vias de recompensa, vemos que a abstinência ao alimento palatável ou droga também causa modificações neuroquímicas, diminuindo a dopamina no núcleo accumbens e aumentando a liberação de acetilcolina pelos interneurônios do accumbens (COLANTUONI et al., 2002). Além disso, os sinais e sintomas da abstinência podem ser influenciados pelo principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso – o GABA (Ácido Gama Aminobutírico) e seus receptores - se eles tiverem uma baixa expressão durante o período de restrição (GLUE; NUTT, 1990). Já o principal neurotransmissor excitatório - o glutamato –, num contexto de consumo crônico de álcool, pode ocasionar uma intoxicação, inibindo sua atividade, agindo através das ligações iônicas de seu receptor, o N-metil-D-aspartato (NMDA). Contudo, a retirada do fator viciante inverte a inibição do receptor NMDA, também determinando sinais e sintomas da abstinência (ADINOFF, 1994). Durante a abstinência, ainda temos um aumento de concentrações de glicocorticóides no cérebro, enquanto no plasma as concentrações podem aumentar ou manterem-se inalteradas (ADINOFF, 1994; GLUE; NUTT, 1990).

Um recente estudo demonstrou que a abstinência do alimento rico em açúcar e gordura oferecido cronicamente induz um aumento de consumo deste alimento quando ele é novamente oferecido (recaída), o que é acompanhado de uma diminuição de tirosina hidroxilase (TH) e P-CREB na amígdala. Esse estudo sugeriu que a retirada dessa dieta rica em gordura pode ativar as

respostas ao estresse e aumentar a vulnerabilidade para consumo de alimentos palatáveis, aumentando o comportamento motivado pela comida. Essas mudanças duradouras no sistema dopaminérgico e os sinais de plasticidade relacionados ao circuito de recompensa também poderiam promover estados emocionais negativos – como comer demais - e recaídas por alimentos palatáveis (SHARMA et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o ambiente precoce afeta o padrão de saúde e doença durante todo o desenvolvimento, até a vida adulta. Evidências clínicas e experimentais demonstram que variações no nível de estresse ou disponibilidade de nutrição no ambiente de início da vida determinam, por exemplo, alterações persistentes no comportamento alimentar, assim como no metabolismo. Por exemplo, o modelo experimental de manipulação neonatal, utilizado no presente trabalho, está associado a um aumento no consumo de alimento palatável (rico em açúcar e gordura) na vida adulta. Considerando que o consumo deliberado de alimentos palatáveis está ligado à obesidade e pode ser julgado viciante, o conhecimento sobre os mecanismos que afetam esse consumo são importantes para a identificação de possíveis populações vulneráveis.

4 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da manipulação neonatal sobre o consumo de dieta palatável em diferentes períodos de exposição a esse tipo de alimento na vida adulta, investigando os desfechos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos em resposta à abstinência, por 24 horas e 7 dias, do alimento palatável em ratas fêmeas adultas.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o consumo de alimento palatável (ração palatável) e de ração padrão, assim como o ganho de peso corporal e a deposição de gordura abdominal em ratas fêmeas, manipuladas e não manipuladas no período neonatal, após 15 e 30 dias de exposição ao alimento palatável em fase adulta;
- Avaliar o consumo de alimento palatável, o peso corporal, o depósito de gordura abdominal e os níveis de corticosterona no soro de ratas fêmeas adultas, manipuladas e não manipuladas no período neonatal, em resposta a 24 horas e 7 dias de abstinência desse tipo de alimento após exposição crônica de 15 dias;
- Verificar os níveis de TH e p-CREB na amígdala de ratas fêmeas adultas, manipuladas e não manipuladas no período neonatal, em resposta a 24 horas e 7 dias de abstinência desse tipo de alimento após exposição crônica de 15 dias.

6 HIPÓTESE

A manipulação neonatal induz uma resposta comportamental e neuroquímica peculiar à abstinência do alimento palatável após a exposição crônica a este tipo de alimento. Em outras palavras, as variações do ambiente neonatal afetam a resposta comportamental e neuroquímica à abstinência do alimento palatável após exposição crônica a este tipo de alimento.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratas Wistar virgens provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS, Porto Alegre - RS, Brasil) e da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL, Pelotas - RS, Brasil), foram randomicamente selecionadas. As ratas fêmeas permaneceram, individualmente, em caixas-moradia, confeccionadas em *Plexiglas*, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de maravalha, e foram mantidas em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, limpeza das caixas uma vez por semana realizada pela equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA/HCPA), ração padrão e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas nesse ambiente pelo período de 14 dias, antes de qualquer procedimento experimental, para permitir aclimação ao biotério. Aos 70 dias de vida, foram acasaladas individualmente com um rato macho (idade em torno de 80 dias de vida) permanecendo na caixa-moradia pelo período de sete dias. As ratas prenhes receberam ração padrão do biotério e água à vontade durante toda a gestação.

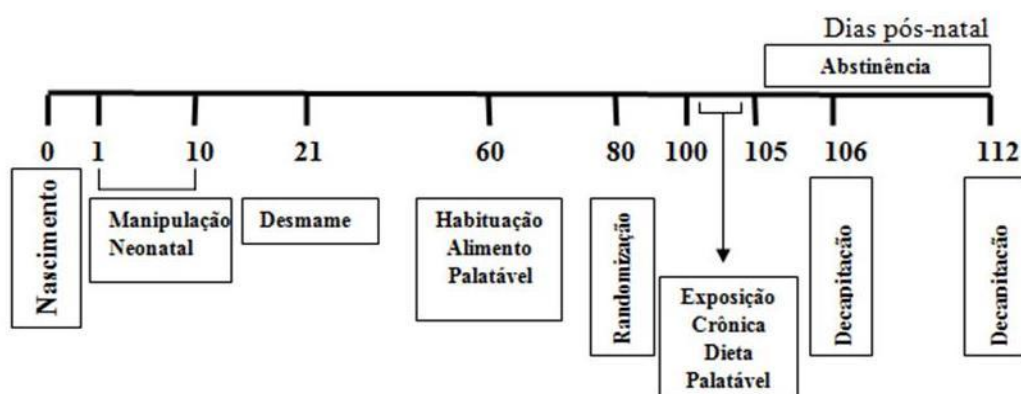
O dia do nascimento foi considerado o dia 0 (zero). Após o nascimento, as ninhadas foram mantidas intactas, exceto para os procedimentos de manipulação que foram realizados entre às 10:00 e 11:00 horas. Mais de uma ninhada foi submetida ao procedimento de manipulação neonatal (dia 1 ao dia 10 de vida) no mesmo dia; então, durante este período de 1 hora de procedimento estava incluído: o tempo para aquecer a incubadora, trazer as caixas-moradia do alojamento para a sala de experimentos do biotério, habituar brevemente as genitoras à nova sala, remover cuidadosamente os filhotes da ninhada, fazer a manipulação em si, retornar os filhotes para a mãe e, novamente, após um breve período, levar a caixa-moradia para o alojamento. O pesquisador tinha o cuidado de trocar as luvas entre a manipulação de cada ninhada, para evitar a dispersão de qualquer tipo de odor de uma ninhada para outra.

As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no dia 21 pós-natal. Foram utilizados, no máximo, dois filhotes fêmeas da mesma ninhada

para o mesmo grupo experimental. Este estudo utilizou somente ratas fêmeas, derivadas de 24 ninhadas, para dar um prosseguimento mais acurado aos trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, avaliando os efeitos da abstinência do alimento palatável em ratas adultas manipuladas no período neonatal (Benetti et al., 2010 ; Benetti et al., 2013). Imediatamente após a separação por sexo, os ratos machos foram destinados a outro projeto. Após o desmame, as fêmeas foram mantidas em torno de 3 a 4 por caixa, recebendo ração padrão e água à vontade, sem qualquer tipo de manipulação até o início da exposição ao alimento palatável (60 dias de vida).

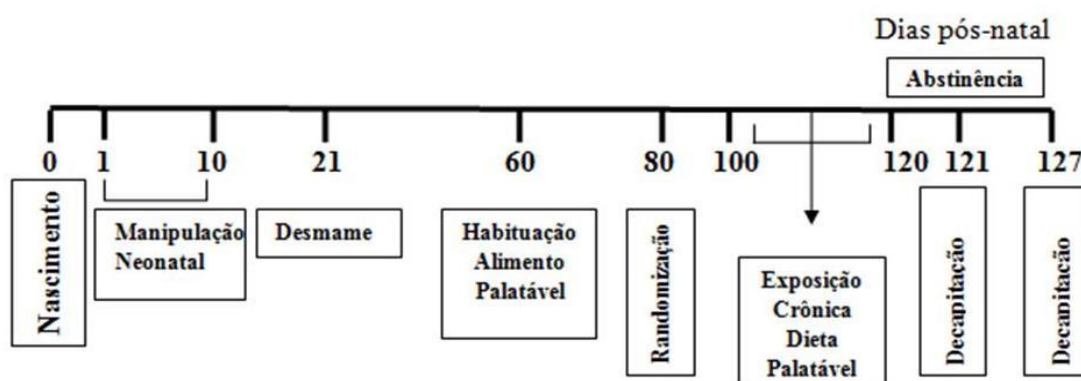
As linhas de tempo abaixo ilustram a sequência dos procedimentos experimentais realizados, nos diferentes momentos da vida das ratas:

Figura 1 - Linha de tempo 1: 15 dias de exposição à dieta palatável, seguidos de 24 horas e 7 dias de abstinência desse tipo de alimento



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 2 - Linha de tempo 2: 30 dias de exposição à dieta palatável, seguidos de 24 horas e 7 dias de abstinência desse tipo de alimento



Fonte: Elaborado pela autora

7.2 MANIPULAÇÃO NEONATAL

As ninhadas foram divididas em dois grupos de intervenção neonatal:

- 1) Não-manipulado: os filhotes permaneceram com a mãe, sem qualquer tipo de manipulação até o desmame. De forma semelhante ao grupo de intervenção, parte da maravalha foi removida cuidadosamente pelo experimentador e, depois, foi colocada maravalha limpa, sem tocar nos filhotes;
- 2) Manipulado: esse procedimento foi realizado conforme previamente descrito por nosso grupo de pesquisa (Silveira et al; 2004; da Silva Benetti et al; 2007). A mãe foi gentilmente afastada da ninhada e os filhotes foram retirados do ninho ao mesmo tempo, sendo imediatamente colocados dentro de uma incubadora ajustada para manter a temperatura ambiente de 30-32°C, enquanto a mãe permaneceu na caixa-moradia ao lado da incubadora. Após 10 minutos, os filhotes voltaram para sua respectiva mãe. Esse procedimento foi realizado do dia 1 ao dia 10 pós-natal (Figura 3).

Figura 3 - Manipulação neonatal



Fonte: Elaborado pela autora

7.3 HABITUAÇÃO AO ALIMENTO PALATÁVEL

A partir do 60º dia de vida, as ratas foram habituadas ao alimento palatável, rico em açúcar e gordura, contendo: 4,59 kcal/g; 47,0% de carboidratos – sendo 20% de sacarose -, 25,0% de proteínas e 23,0% de

gordura (Prag Soluções, Jaú-SP, Brasil). Para esse experimento, uma porção previamente pesada de ração palatável foi colocada em uma das extremidades da caixa-moradia para habituar as ratas ao alimento novo. As ratas foram habituadas, individualmente, ao alimento palatável sob a restrição alimentar (em torno de 80% do consumo habitual), durante 5 dias consecutivos, por 3 minutos cada dia. No 6º dia, as ratas foram testadas para o consumo de alimento palatável, sendo expostas, assim como na habituação por 3 minutos, a uma porção previamente pesada desse tipo de alimento, porém após terem recebido ração padrão *ad libitum* nas 24 horas prévias. Após esse período de habituação, as ratas receberam ração padrão *ad libitum*. Todos os procedimentos seguintes foram realizados com as fêmeas em estado alimentado (Figura 4).

Figura 4 - Habituação ao alimento palatável na caixa-moradia



Fonte: Elaborado pela autora

7.4 EXPERIMENTO 1: EXPOSIÇÃO CRÔNICA À DIETA PALATÁVEL – COMPARAÇÃO ENTRE 15 DIAS E 30 DIAS DE CONSUMO DA DIETA

Entre os dias 80 e 100 de vida, todas as ratas foram pesadas e randomizadas em diferentes grupos, conforme o peso corporal, sendo colocadas em números de 3 a 4 por caixa. Os grupos de ratas, manipuladas e não manipuladas, foram expostos a dois diferentes períodos de tempo de

exposição crônica à dieta palatável, onde eram oferecidas dietas padrão e palatável concomitantemente, sendo subdivididos em:

- a) 15 dias de exposição crônica à dieta palatável: 1) Não manipulada + ração palatável + ração padrão e 2) Manipulada + ração palatável + ração padrão;
- b) 30 dias de exposição crônica à dieta palatável: 1) Não manipulada + ração palatável + ração padrão e 2) Manipulada + ração palatável + ração padrão.

Uma semana após a randomização nos grupos de dieta descritos acima, as ratas passaram a receber o alimento palatável à vontade na caixa-moradia. Durante 15 e 30 dias, porções previamente pesadas de ração palatável e de ração padrão foram oferecidas e a quantidade restante foi medida para avaliar o consumo durante a primeira semana (diariamente) e, depois, a cada 72 horas de exposição crônica à dieta. O consumo de alimentos foi medido por caixa, obtendo-se, assim, o consumo médio por caixa. O peso corporal foi aferido uma vez por semana ao longo dos dois períodos de exposição crônica à dieta.

7.5 EXPERIMENTO 2: ABSTINÊNCIA DA DIETA PALATÁVEL – COMPARAÇÃO ENTRE 24 HORAS E 7 DIAS DE PRIVAÇÃO DO ALIMENTO PALATÁVEL

Após o período de exposição à dieta palatável, os grupos de ratas manipuladas e não manipuladas foram privados do alimento palatável, sendo subdivididos nos seguintes subgrupos:

- a) Sem abstinência: ratas fêmeas permaneceram recebendo ração padrão + dieta palatável continuamente até o momento da decapitação;
- b) 24 horas de abstinência da dieta palatável: ratas fêmeas foram privadas do alimento palatável, passando a receber apenas ração padrão 24h antes da decapitação;
- c) 7 dias de abstinência da dieta palatável: ratas fêmeas foram privadas do alimento palatável, passando a receber apenas ração padrão 7 dias antes da decapitação.

Imediatamente após cada um dos períodos de abstinência à dieta palatável (24 horas e 7 dias), as ratas foram testadas quanto ao consumo do alimento palatável, sendo colocadas, em estado alimentado, no mesmo aparato utilizado na habituação a esse tipo de alimento e a quantidade consumida da ração palatável foi medida após 10 minutos de exposição. O peso corporal também foi aferido após cada um dos períodos de abstinência ao alimento palatável.

7.6 COLETA DE SORO E DISSECAÇÃO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS E DE TECIDOS

Após o teste do consumo de alimento palatável, as fêmeas foram submetidas a um período de jejum de 4 horas e, em seguida, decapitadas para coleta de sangue e tecidos. O sangue foi coletado em tubos coletores para determinação dos níveis de corticosterona. Os tubos foram centrifugados a 4°C, 4.000 rpm, por 10 minutos e o soro foi separado em alíquotas e congelado a -20°C até o dia das análises bioquímicas.

Os cérebros foram removidos imediatamente após a decapitação, sendo rapidamente congelados através de imersão em isopentano e armazenados a -80°C. Posteriormente, os cérebros, ainda congelados, foram fatiados e a amígdala (localizada sobre a face dorsal do bulbo) foi dissecada, armazenada a -80°C para posterior quantificação de TH (tirosina hidroxilase) e p-CREB (cAMP response element-binding protein), através da técnica de Western Blotting.

As duas maiores porções da gordura abdominal (inguinal e retroperitoneal) foram dissecadas e pesadas separadamente, usando-se uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. A gordura abdominal total foi expressa como porcentagem de peso corporal.

7.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os níveis de corticosterona no soro foram determinados pelo método de ELISA, utilizando-se kit comercial ENZO (Life Science- Ann Arbor, Michigan, EUA).

7.8 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

A quantificação de tirosina hidroxilase e p-CREB na amígdala foi realizada por meio da técnica de Western Blotting. O material para realização da técnica foi extraído através de “*punches*” na região da amígdala (localizada sobre a face dorsal do bulbo, Paxinos; Watson, 2007). Foi realizada a extração citosólica da amostra, utilizando-se tampão de extração com Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIC) (cat: P8340, Sigma); phospho stop (4906845001, Roche); NEB 1 (HEPES 0,24 g (10 mM): 2,5 M KCl 400 μ l (10 mM), 0,2 M EDTA 50 μ l (0,1 mM), 0,5 M EGTA 20 μ l (0,1 mM); pH: 7,9. Logo após, as proteínas totais teciduais foram quantificadas por meio de kit comercial (Pierce* BCA* Protein Assay, cat: 23225, Thermo Scientific). Em seguida, amostras com 20mcg/dl de proteína foram processadas com LDS e DTT (Sample Loading Buffer e DL-Dithiothreitol) e desnaturadas a 95 °C por 3min. Na sequência, foram pipetadas, nos poços do gel, NUPAGE 4-12% bis-tris gel (Bis-Tris-HCl buffer (pH 6.4), Acrylamide, Bis-acrylamide, APS, Ultrapure water) (INVITROGEN, cat: NP0323BOX) usando-se, como marcador de peso molecular, o Magic Mark XP (INVITROGEN, cat: LC5602). A corrida foi feita com tampão específico (NUPAGE MES SOS running buffer 20x, INVITROGEN, cat: np002) com antioxidante (Nupage antioxidant, INVITROGEN, cat: np005) por 1:30h, 120V, 100mA. A transferência foi feita para a membrana de nitrocelulose (hybond-C Amersham biosciences nitrocelulose 0,4 micron 30 cm x 3 m roll, GE heathcare, cat: RPN303C), empregando-se tampão específico (NUPAGE transfer buffer 20 x, INVITROGEN, cat: np006) por 1:30h, 30V, 400mA. Após a transferência, foi colocada solução de Ponceau no intuito de verificar a presença de proteínas na membrana (Sigma-Aldrich, cat: P7170-1L). O bloqueio da membrana deu-se usando leite em pó desnatado 5% em TBS-T e incubou-se “*overnight*” a 4°C com o anticorpo primário (ver abaixo).

No dia seguinte, a membrana foi incubada por 2 horas com anticorpo secundário específico. Após esse processo, foi realizada a revelação da membrana na câmara escura, empregando-se ECL (ECL western blotting analysis system, GE heathcare, cat: RNP 2106). A quantidade de proteína de interesse foi calculada através do software Image J® (SRINIVASAN; DUNN,

2011; KURIEN; HAL SCOFIELD, 2006; CORDEIRA et al., 2010). Para a dosagem de tirosina hidroxilase (TH) e fosfo-CREB na amígdala, foram adotados os seguintes anticorpos: TH (1:5000) (anti-tyrosine hydroxylase, peso molecular: 60 KDa, Sigma-Aldrich, cat: T2928), pCREB (1:500) (anti-phospho-CREB, peso molecular: 60 KDa, INVITROGEN, cat: 368600), anti-mouse (1:2000) (Amersham ECL Anti-Mouse IgG, GE healthcare, cat: NA 931), anti-rabbit (1:2000) (Amersham ECL Anti-Rabbit IgG, GE healthcare, cat: NA 934), actina (1:1000) (Monoclonal Anti-Actina (A4700, Sigma).

7.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M), previamente digitados e analisados pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão (18.0) (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). As análises que foram realizadas por ANOVA de duas vias (consumo no teste da habituação, consumo do alimento palatável no teste comportamental, peso corporal e depósito de gordura abdominal após abstinência, assim como níveis de corticosterona, TH e p-CREB após abstinência) ou por ANOVA de medidas repetidas, adotaram o grupo neonatal como fator (consumo na habituação, consumo de ração palatável e de ração padrão, e peso corporal durante período de exposição à dieta) e foram seguidas pelo teste post-hoc de Tukey, quando indicado. Teste t de *Student* também foi utilizado (depósito de gordura abdominal após exposição à dieta). O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%. O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base em outros estudos como os de Silveira et al. (2006) e Benetti et al. (2007). Para detectar uma diferença de 1,25 desvios-padrão entre os grupos, adotou-se um nível de significância de 5% e um poder de 80%, chegando-se a um n de 7/grupo.

7.10 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos animais foram aprovados em seus aspectos éticos e metodológicos, em conformidade com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente com a Lei 11.794 de 08/10/2008

(BRASIL, 2008), que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG/HCPA) (Projeto número 11-0025).

8 RESULTADOS

8.1 EXPERIMENTO 1

8.1.1 Números de filhotes por ninhada e peso aos 60 e 90 dias pós-natal

Inicialmente, para verificar a homogeneidade entre os grupos de intervenção neonatal (manipulados e não manipulados), foi realizada uma comparação entre esses grupos do número de filhotes por ninhada e do peso corporal das fêmeas antes da randomização nos diferentes períodos de exposição à dieta palatável (15 e 30 dias de exposição). Não foi detectada diferença entre os grupos de manipulação neonatal no número de filhotes nem no peso aos 60 e 90 dias de vida das ratas fêmeas (Teste T de *Student*, $P > 0,05$). A Tabela 1 ilustra esses dados.

Tabela 1 - Número de filhotes por ninhada e peso corporal antes da randomização nos diferentes períodos de exposição à dieta palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal

| Grupo Neonatal | Filhotes/ninhada | Peso aos 60 dias | Peso aos 90 dias |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| Não manipulado | 10,89 ± 0,68 | 186,13 ± | 224,04 ± |
| | | 2,82 | 2,08 |
| Manipulado | 12,20 ± 0,51 | 191,88 ± | 225,99 ± |
| | | 3,76 | 2,23 |

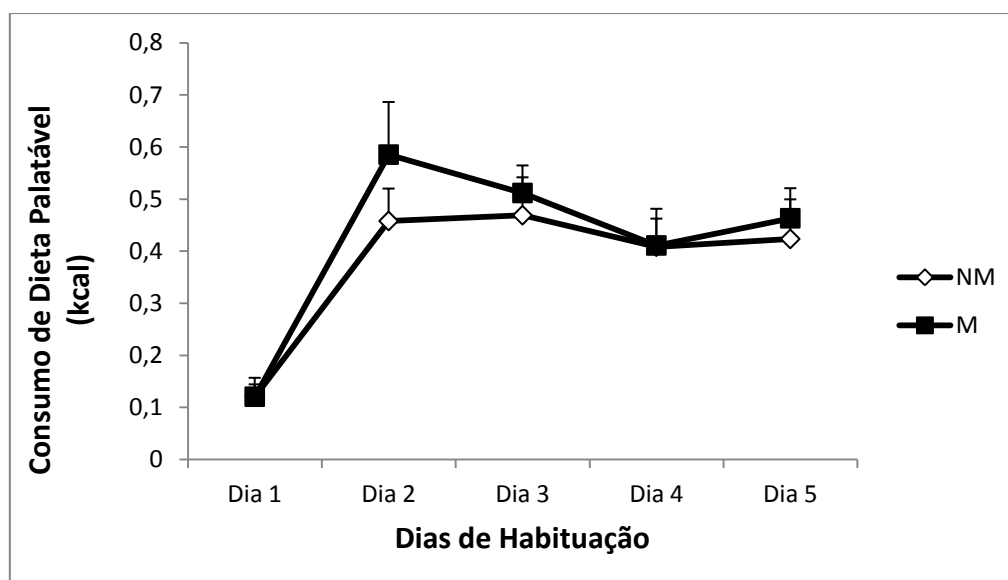
Fonte: Elaborado pela autora.

Dados expressos em média ± erro padrão da média (E.P.M.). O número de filhotes por ninhada não foi diferente entre os grupos de intervenção neonatal. Da mesma forma, o peso corporal aos 60 e 90 dias de vida, antes da randomização nos grupos de exposição à dieta palatável, não diferiu entre animais manipulados e não manipulados (Teste T de *Student*, $P > 0,05$).

8.1.2 Habituação ao alimento palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal

Durante o período de 5 dias de habituação ao alimento palatável, observou-se um efeito do tempo, onde a habituação ocorreu no segundo dia de exposição e posteriormente o consumo caiu em um plateau, tanto nos animais manipulados quanto nos não manipulados, no período neonatal [ANOVA de medidas repetidas, $F(2,71; 370,96) = 16,719$, $P < 0,001$]. No dia do teste (dia 6), não foi detectada diferença no consumo de alimento palatável entre os grupos de intervenção neonatal (Teste T de *Student*, $P > 0,05$). As Figuras 5 e 6 ilustram esses resultados.

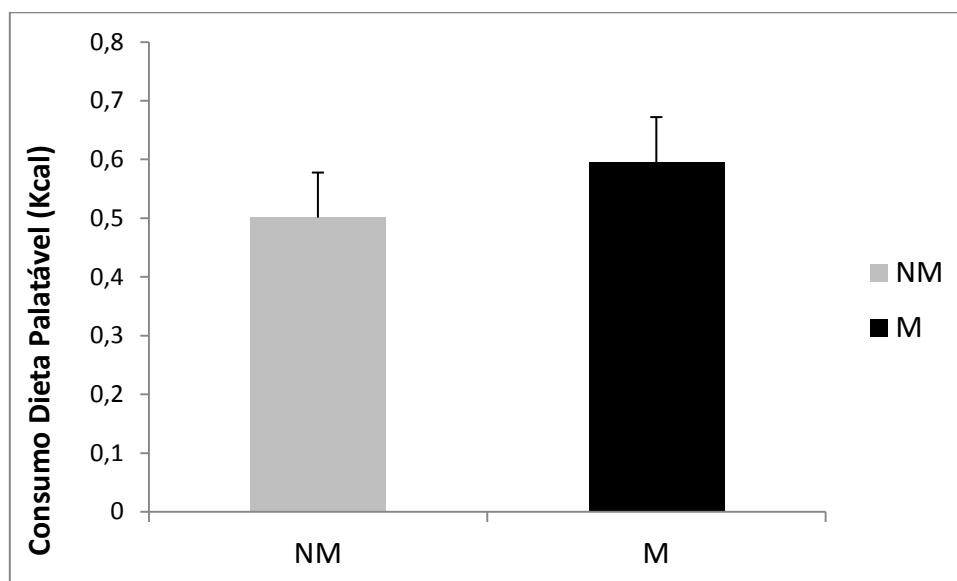
Figura 5 - Gráfico do consumo de alimento palatável durante a habituação



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 5 mostra o consumo do alimento palatável durante os 5 dias de habituação em animais manipulados (M, $n=56$) e não manipulados (NM, $n=31$) no período neonatal. Dados expressos em média \pm E.P.M. Observou-se um efeito do tempo aumentando o consumo do alimento palatável ao longo dos 5 dias de habituação (ANOVA de medidas repetidas, $P < 0,001$).

Figura 6 - Gráfico do consumo de alimento palatável no dia do teste após habituação



Fonte: Elaborado pela autora.

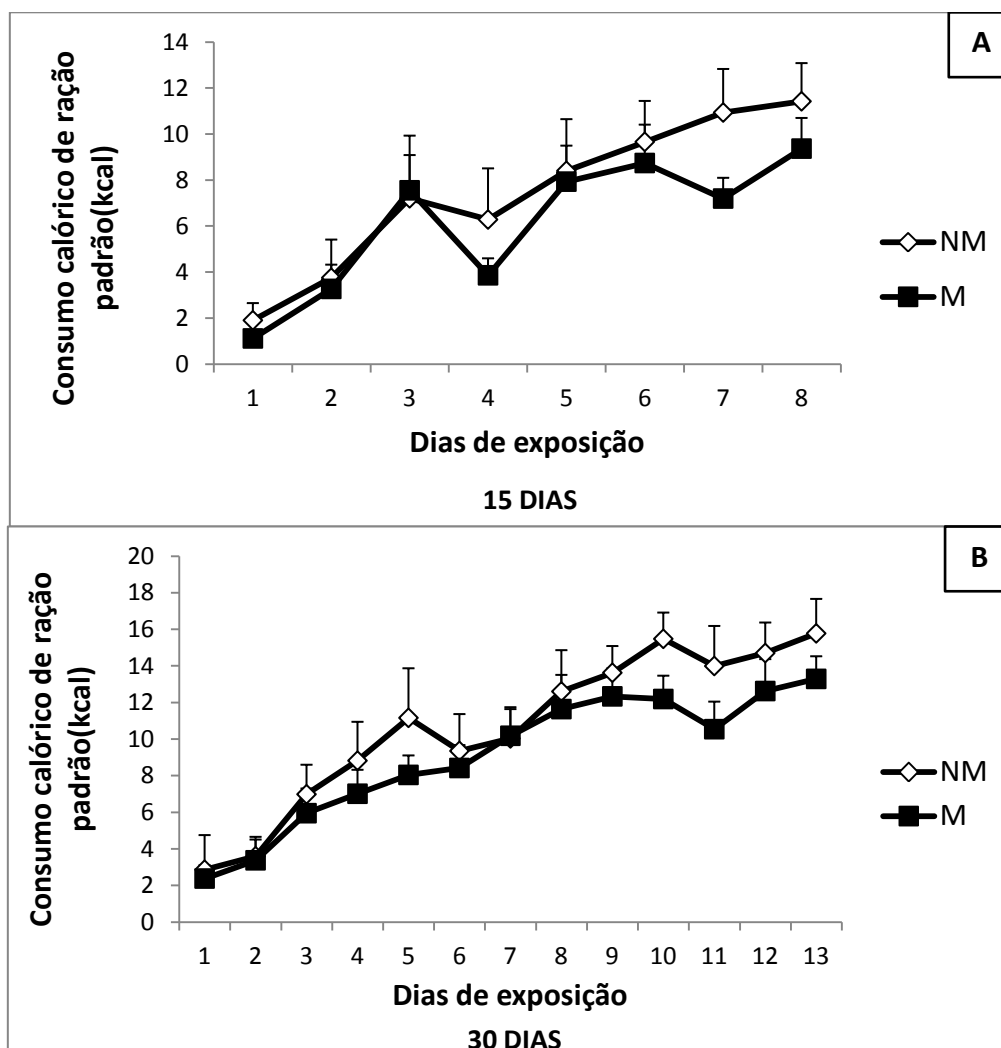
Figura 6 acima se pode ver o consumo do alimento palatável no dia do teste (dia 6) em animais manipulados (M, n=56) e não manipulados (NM, n=31) no período neonatal. Dados expressos em média \pm E.P.M. Não foi observada diferença no consumo da dieta palatável entre os grupos de intervenção neonatal (Teste T de *Student*, $P > 0,05$).

8.1.3 Consumo calórico de ração padrão e palatável, durante 15 e 30 dias de exposição à dieta palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal

Conforme previamente descrito em detalhes na seção Materiais e Métodos, entre os 80 e 100 dias de vida, um subgrupo de animais passou a receber, por 15 dias e outro subgrupo por 30 dias, na caixa-moradia, alimento palatável (juntamente com a ração-padrão) à vontade, e o consumo foi mensurado. Ao longo do período de 15 dias de exposição à dieta palatável, o consumo calórico de ração padrão aumentou com o passar dos dias de exposição [ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $F(3,30; 59,47) = 10,754$, $P < 0,001$, correção para Greenhouse-Geisser]. Entretanto, não

foi detectada diferença entre os grupos de intervenção neonatal (manipulados e não manipulados) e nem interação [ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$, para manipulação neonatal], ilustrados na figura 7(A). Similarmente ao período de 15 dias de exposição à dieta palatável, outro subgrupo de animais, foi submetido a um período de 30 dias de exposição crônica à dieta palatável. Durante esse período de exposição à dieta palatável, foi constatado um aumento no consumo calórico de ração padrão com o passar do tempo [ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $F(4,39; 92,20) = 24,408$, $P < 0,001$, correção para Greenhouse-Geisser]. Entretanto, não foi detectada diferença no consumo de ração padrão entre os grupos de intervenção neonatal (manipulados e não manipulados) e nem interação [ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$, para manipulação neonatal]. A Figura 7(B) expõe esses resultados.

Figura 7 - Gráfico do consumo calórico de ração padrão durante 15 dias e 30 dias de exposição à dieta palatável



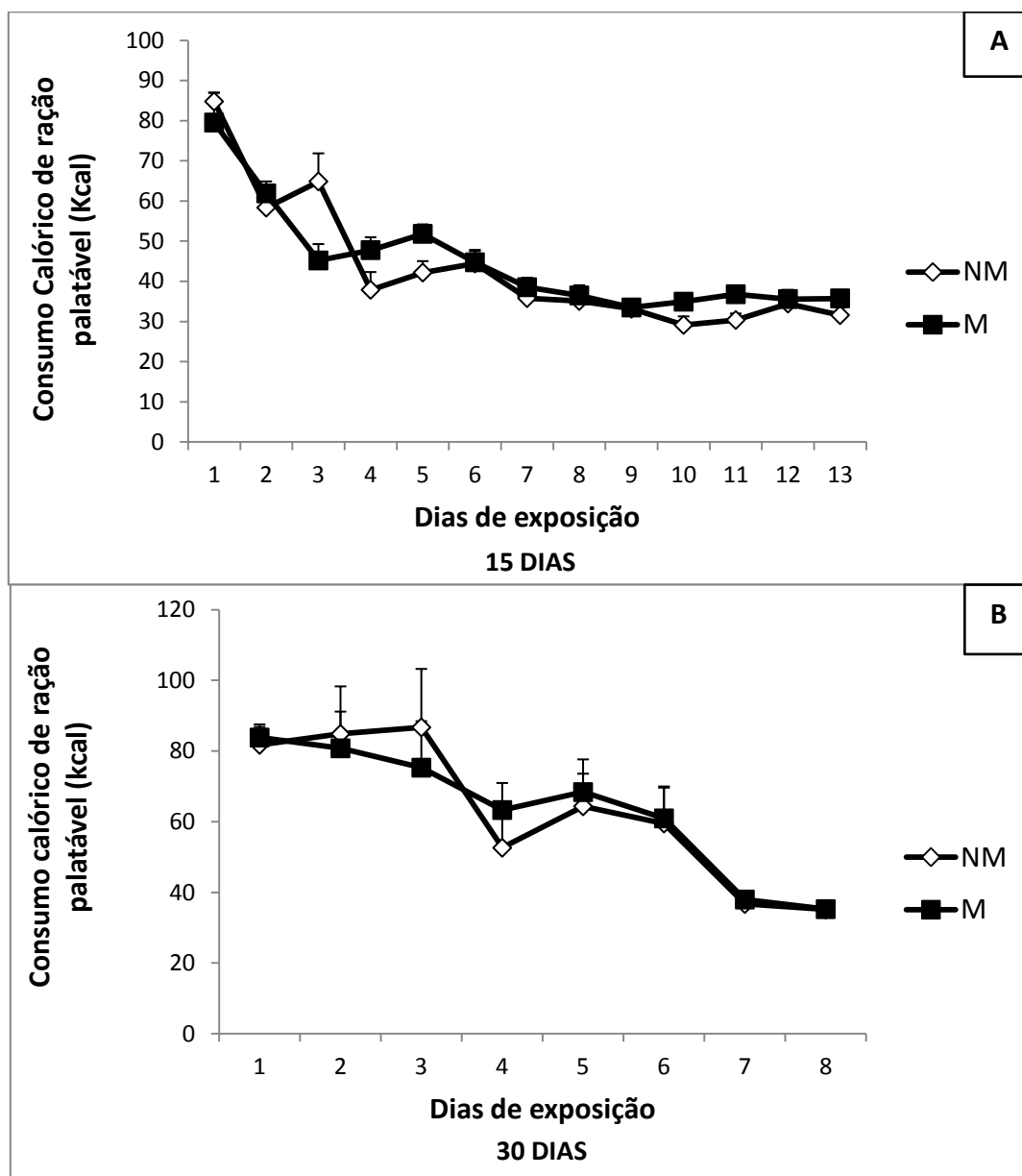
Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 7(A) expõe o consumo calórico de ração padrão durante 15 dias de exposição à dieta palatável em animais manipulados (M, n=12) e não manipulados (NM, n=8) no período neonatal. Dados expressos em média \pm E.P.M. Observou-se um efeito do tempo aumentando o consumo de ração padrão (ANOVA de medidas repetidas, $P < 0,001$), sem diferença entre os grupos de intervenção neonatal, nem interação (ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$). A figura 7(B) ilustra o consumo calórico de ração padrão durante 30 dias de exposição crônica à dieta palatável em animais manipulados (M, n=13) e não manipulados (NM, n=10) no período neonatal. Detectou-se um efeito do tempo, aumentando o consumo de ração padrão (ANOVA de medidas

repetidas, $P < 0,001$), sem diferença entre os grupos de intervenção neonatal e sem interação (ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$).

Em relação ao consumo de ração palatável, ao longo do período de 15 dias de exposição a esse tipo de dieta, foi observada uma redução no consumo calórico desse tipo de alimento com o passar do tempo de exposição [ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $F(1,99; 35,81) = 14,428$, $P < 0,001$, correção para Greenhouse-Geisser], sem diferença entre animais manipulados e não manipulados no período neonatal e sem interação [ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$, para manipulação neonatal, Figura 8(A)]. Assim como o consumo durante os 15 dias, o consumo da dieta palatável, ao longo do período de 30 dias de exposição, foi observado um declínio no consumo calórico desse tipo de alimento com o passar do tempo [ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $F(3,12; 65,60) = 45,416$, $P < 0,001$, correção para Greenhouse-Geisser]. Entretanto uma interação foi detectada, mostrando que, com o passar do tempo de exposição à dieta palatável, há maior redução no consumo desse tipo de alimento nos animais não manipulados, quando comparados aos animais manipulados no período neonatal [ANOVA de medidas repetidas, interação entre tempo e grupo, $F(3,12; 65,60) = 3,108$, $P = 0,031$], sem efeito isolado do grupo de intervenção neonatal [ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$ para manipulação neonatal]. A figura 8(B) apresenta esses resultados.

Figura 8 - Gráfico do consumo calórico de ração palatável durante 15 e 30 dias de exposição à dieta palatável



Fonte: Elaborado pela autora.

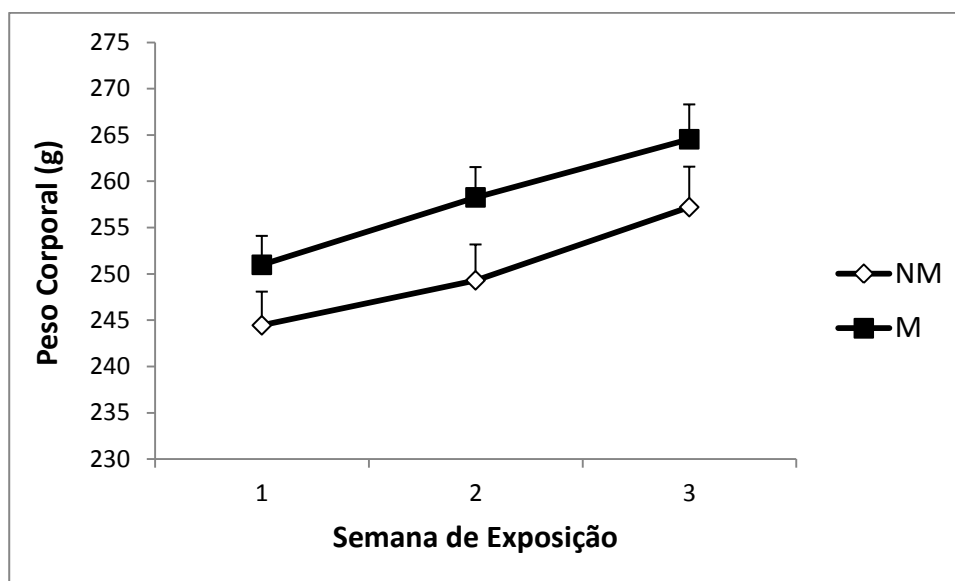
A Figura 8(A) traz o consumo calórico de ração palatável durante 15 dias de exposição a esse tipo de dieta em animais manipulados (M, n=12) e não manipulados (NM, n=8) no período neonatal. Dados expressos em média \pm E.P.M. Efeito do tempo diminuindo o consumo de ração palatável (ANOVA de medidas repetidas, $P < 0,001$), sem diferença entre os grupos de intervenção neonatal, nem interação (ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$). A figura 8(B) ilustra o consumo calórico de ração palatável durante 30 dias de exposição a

esse tipo de dieta em animais manipulados (M, n=13) e não manipulados (NM, n=10) no período neonatal. Efeito do tempo diminuindo o consumo (ANOVA de medidas repetidas, $P < 0,001$), e interação entre tempo e grupo mostrando uma maior redução no consumo com o passar do tempo em animais não manipulados comparado com manipulados (ANOVA de medidas repetidas, $P = 0,031$).

8.1.4 Ganho de peso corporal e acúmulo de gordura abdominal em animais manipulados e não manipulados, no período neonatal, expostos por 15 e 30 dias à dieta palatável

O ganho de peso corporal foi mensurado semanalmente, durante 15 dias de exposição à dieta palatável. Nesse período, foi observado um aumento no peso corporal em ambos os grupos de animais (manipulados e não manipulados) [ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $F(1,0; 65) = 57,445$ $P < 0,001$, correção para Greenhouse-Geisser. Peso médio \pm E.P.M na primeira semana de exposição à dieta: $241,77g \pm 3,39$ em animais manipulados e $246,51g \pm 3,78$ em animais não manipulados. Peso médio \pm E.P.M na segunda semana de exposição: $256,92g \pm 4,54$ em animais manipulados e $258,09g \pm 4,99$ em animais não manipulados no período neonatal, sem um efeito isolado do grupo de intervenção neonatal, nem interação [ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$, para manipulação neonatal]. Semelhante a evolução de peso corporal durante os 15 dias de exposição à dieta palatável, no período de 30 dias de exposição à mesma também foi observado aumento no peso corporal [ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo, $F(2; 142) = 60,815$ $P < 0,001$], sem diferença entre os grupos de intervenção neonatal (manipulados e não manipulados), nem interação [ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$, para manipulação neonatal, Figura 9].

Figura 9 - Gráfico do peso corporal durante 30 dias de exposição à dieta palatável

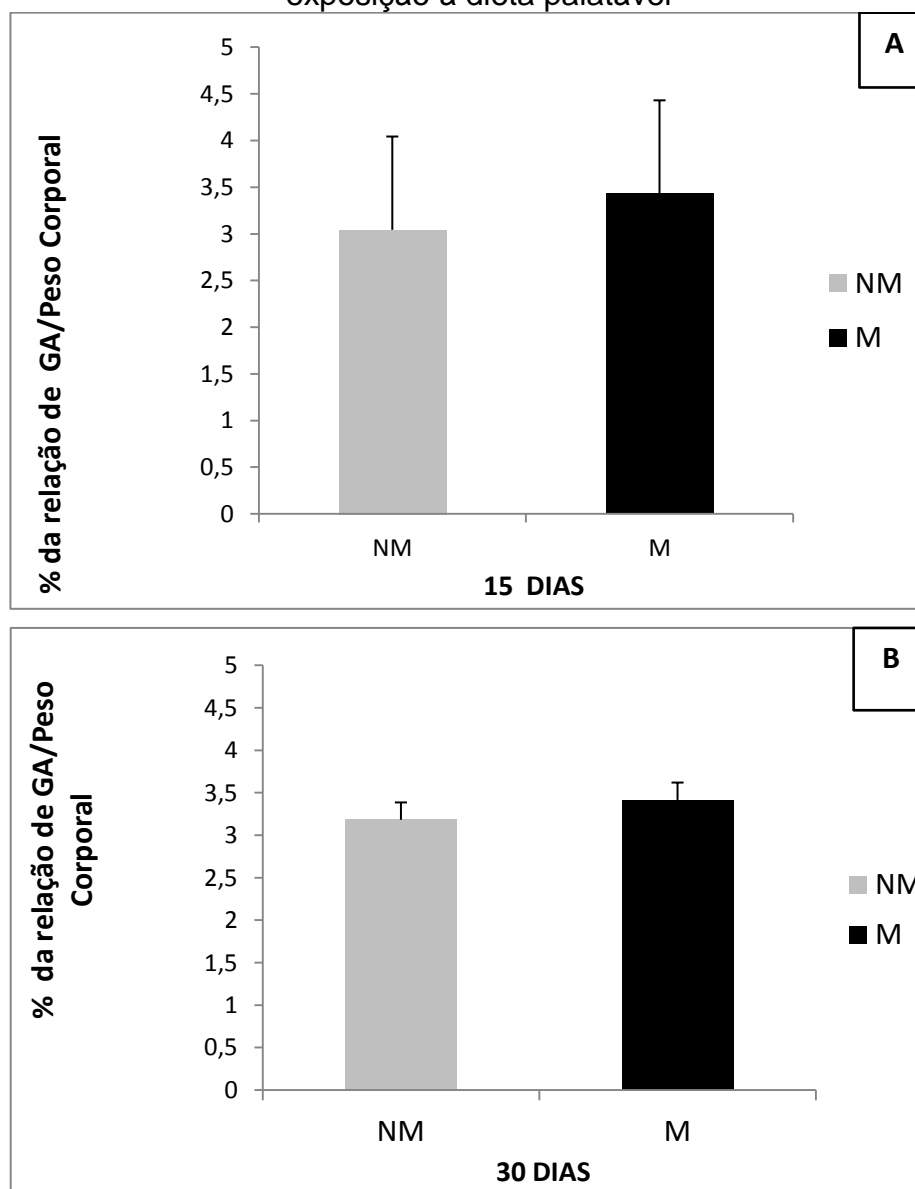


Fonte: Elaborado pela autora.

Pela Figura 9 vê-se o peso corporal durante 30 dias de exposição à dieta palatável em animais manipulados (M, n=26) e não manipulados (NM, n=19) no período neonatal. Dados expressos em média \pm E.P.M. Efeito do tempo aumentando o ganho de peso (ANOVA de medidas repetidas, $P < 0,001$), sem efeito do grupo de intervenção neonatal, nem interação (ANOVA de medidas repetidas, $P > 0,05$).

O depósito de gordura abdominal, em relação ao peso corporal, foi mensurado após o período de 15 dias de exposição ao alimento palatável. Não foi observada diferença no acúmulo de gordura abdominal em animais manipulados, quando comparados com animais não manipulados no período neonatal (Teste T de *Student*, $P > 0,05$), demonstrado na figura 10(A). De forma semelhante aos animais expostos à dieta palatável durante 15 dias, a exposição crônica a esse tipo de dieta por 30 dias não determinou diferença estatística no acúmulo de gordura abdominal entre animais manipulados e não manipulados no período neonatal (teste T de *Student*, $P > 0,05$). Resultado apresentado na figura 10(B).

Figura 10 - Gráfico do depósito de gordura abdominal após 15 e 30 dias de exposição à dieta palatável



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 10(A) expõe o depósito de gordura abdominal após 15 dias de exposição à dieta palatável em animais manipulados (N=25) e não manipulados (N=17). Dados expressos em média \pm E.P.M. Não houve diferença entre os grupos de intervenção neonatal no acúmulo de gordura abdominal (Teste T de *Student*, $P > 0,05$). Na figura 10(B) demonstra o gráfico do depósito de gordura abdominal em ratas manipuladas (N=26) e não manipuladas (N=19) no período neonatal após 30 dias de exposição crônica à dieta palatável. Sem diferença entre os grupos de intervenção neonatal (Teste T de *Student* $P > 0,05$).

8.1.5 Comparação entre 15 e 30 dias de exposição crônica

Uma comparação entre os diferentes períodos de exposição à dieta palatável foi realizada, considerando-se variáveis comportamentais (por exemplo: preferência pelo alimento palatável, calculada pela razão entre o consumo calórico proveniente da dieta palatável e o consumo calórico total) e variáveis metabólicas (ex.: delta de peso corporal, determinado através da diferença entre o peso final e o peso inicial do período de exposição à dieta). Após essa análise, verificou-se uma similaridade no delta de peso corporal entre os grupos de animais expostos por 15 dias e por 30 dias à dieta palatável (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$ para grupo e tempo de exposição à dieta), embora um efeito esperado do tempo de exposição à dieta [ANOVA de duas vias, $F(1;39) = 17,367$, $P < 0,001$] tenha demonstrado uma maior preferência pelo alimento palatável nos animais expostos por 15 dias em comparação àqueles expostos por 30 dias, porém sem diferença entre os grupos de intervenção neonatal. Dessa forma, considerando a semelhança entre os grupos de tempo de exposição à dieta palatável, no Experimento 2, optou-se pelo seguimento das avaliações bioquímicas e neuroquímicas apenas no grupo de animais expostos à dieta palatável por 15 dias, reduzindo, assim, o tempo de realização dos experimentos. A tabela 2 mostra esses resultados.

Tabela 2 - Delta do peso corporal e índice de preferência pelo alimento palatável em animais manipulados e não manipulados no período neonatal, conforme o tempo de exposição à dieta palatável

| Grupo de intervenção neonatal | Tempo de exposição à dieta palatável | Delta peso corporal (g) | Índice de preferência pelo alimento palatável (%) |
|--------------------------------------|---|--------------------------------|--|
| Não manipulada | 15 dias | $11,57 \pm 2,87$ | $88,8 \pm 2,3$ |
| | 30 dias | $12,76 \pm 1,79$ | $80,0 \pm 2,8$ |
| Manipulada | 15 dias | $15,14 \pm 2,13$ | $91,10 \pm 1,0$ |
| | 30 dias | $13,56 \pm 1,71$ | $83,20 \pm 1,7$ |

Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 2 elucida os dados expressos em média \pm E.P.M. O delta de peso corporal foi semelhante entre os grupos de animais expostos por 15 dias e por 30 dias à dieta palatável (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$ para grupo e tempo de exposição à dieta). No índice de preferência pelo alimento palatável, foi observado um efeito do tempo de exposição à dieta (ANOVA de duas vias, $P < 0,001$), demonstrando uma maior preferência pelo alimento palatável nos animais expostos por 15 dias em comparação àqueles expostos por 30 dias, mas sem diferença entre animais manipulados e não manipulados.

8.2 EXPERIMENTO 2

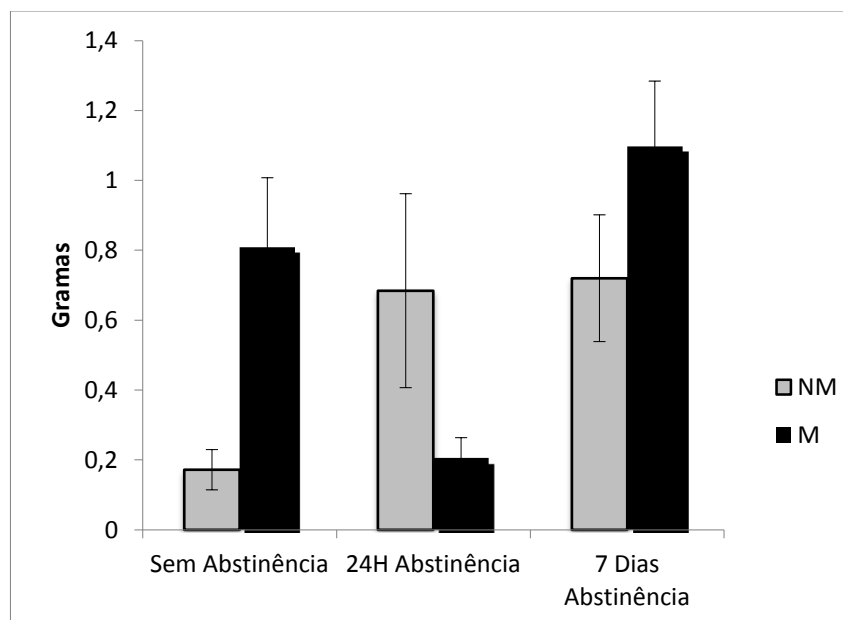
8.2.1 Avaliação do comportamento alimentar após 24 horas e 7 dias de abstinência à dieta palatável, em animais manipulados e não manipulados, no período neonatal, expostos a esse tipo de dieta por 15 dias na vida adulta.

Conforme descrito em detalhes na seção Materiais e Métodos, passados 15 dias de exposição à dieta palatável, um subgrupo de animais foi submetido ao período de abstinência à dieta palatável por 24 horas, e outro subgrupo por 7 dias de abstinência. Imediatamente após esse período de privação do alimento palatável, os animais foram testados quanto ao consumo desse tipo de alimento em um teste de comportamento alimentar. No dia do teste, os animais manipulados e não manipulados, submetidos à abstinência ou não, foram expostos, por 10 minutos, a uma porção previamente pesada do alimento palatável, e o consumo foi medido após este curto período de tempo.

Assim, comparando os grupos de animais que sofreram abstinência à dieta palatável e aqueles que não foram privados desse tipo de dieta, constatou-se um efeito isolado do tempo de abstinência [ANOVA de duas vias, efeito do tempo de abstinência, $F(5, 57)=6,267$, $P=0.026$], mostrando que os animais que sofreram privação da dieta palatável durante 7 dias consumiram mais alimento palatável do que os outros tempos de abstinência, entretanto sem efeito do grupo [$F(5, 57)=0,605$, $P=0,541$]. Através das análises de Post Hoc demonstrou-se que os animais manipulados sem abstinência consumiam mais dieta palatável do que os ratos não manipulados no período neonatal

(Tukey, $p=0,015$). Depois de 24 horas de privação ao alimento palatável os animais manipulados diminuíram o consumo da dieta palatável quando comparados com os ratos manipulados no período neonatal sem abstinência ($p=0,035$). Após 7 dias de restrição da dieta palatável existe uma tendência dos animais não manipulados no período neonatal aumentarem a ingestão do alimento palatável em relação aos ratos não manipulados no período neonatal e sem abstinência da dieta palatável ($p=0,055$). Entretanto passados 7 dias de abstinência ao alimento palatável os animais manipulados aumentaram a sua ingestão dessa dieta sendo significativamente maior que os ratos manipulados que sofreram restrição da dieta palatável por 24 horas ($p=0,028$), mas semelhante aos animais manipulados no período neonatal sem abstinência ($p=0,990$). Além disso, uma interação entre grupo e tempo de abstinência foi detectada mostrando que os animais manipulados no período neonatal, e que sofreram abstinência à dieta palatável por 7 dias, consumiram mais alimento palatável do que os não manipulados [ANOVA de duas vias, interação entre grupo e tempo de abstinência, $F(5, 57)=11,453$, $P=0,002$], (Figura 11)

Figura 11 - Gráfico do consumo de alimento palatável - teste de comportamento alimentar conforme o tempo de abstinência à dieta palatável



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 11 ilustra o consumo de alimento palatável durante o teste de comportamento alimentar (10 minutos) de acordo com o tempo de abstinência à dieta palatável em animais manipulados (M, n=25) e não manipulados (NM, n=17) no período neonatal. Dados expressos em média \pm E.P.M. Efeito do tempo de abstinência (ANOVA de duas vias, $P=0,026$), mas sem efeito do grupo, $P>0,05$). Interação entre grupo e tempo de abstinência (ANOVA de duas vias, $P=0,002$).

8.2.2 Avaliação do peso corporal, do acúmulo de gordura abdominal e dos níveis de corticosterona no soro após 24 horas e 7 dias de abstinência à dieta palatável, em animais manipulados e não-manipulados, no período neonatal, expostos a esse tipo de dieta por 15 dias na vida adulta.

O peso corporal o acúmulo de gordura abdominal e os níveis de corticosterona no soro dos animais foram avaliados após cada um dos diferentes períodos de abstinência à dieta palatável (24h e 7 dias) nas ratas fêmeas expostas durante 15 dias ao alimento palatável. Com relação ao peso corporal, não foi observada diferença entre ratas manipuladas e não manipuladas no período neonatal após 24h e 7 dias de abstinência à dieta palatável e nem interação (ANOVA de duas vias, $P>0,05$ para grupo de intervenção neonatal e tempo de abstinência). O acúmulo de gordura abdominal também não diferiu entre os grupos de ratas manipuladas e não manipuladas após 24h e 7 dias de abstinência ao alimento palatável, e nenhuma interação foi observada (ANOVA de duas vias, $P>0,05$). Os níveis de corticosterona no soro também não diferiram entre os grupos de animais manipulados e não manipulados após os diferentes tempos de abstinência ao alimento palatável também não ocorreu nenhuma interação (ANOVA de duas vias, $P>0,05$). A tabela 3 elucida esses dados.

Tabela 3 - Peso corporal e depósito de gordura abdominal e níveis de corticosterona em ratas fêmeas manipuladas e não manipuladas no período neonatal após diferentes tempos de abstinência à dieta palatável

| Variáveis | Sem Abstinência | | 24h Abstinência | | 7dias Abstinência | |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | NM | M | NM | M | NM | M |
| Peso Corporal (g) | 251,84 \pm | 256,78 \pm | 257,40 \pm | 256,88 \pm | 261,10 \pm | 257,62 \pm |
| | 8,50 | 3,38 | 9,82 | 6,72 | 8,26 | 11,81 |
| %rel. GA/peso corporal | 3,25 \pm 0,28 | 3,73 \pm 0,29 | 2,83 \pm 0,22 | 3,57 \pm 0,30 | 2,91 \pm 0,41 | 2,43 \pm 0,28 |
| Corticosterona (pg/dl) | 197,66 \pm 76,32 | 262,23 \pm 34,99 | 243,84 \pm 79,29 | 300,55 \pm 89,77 | 186,68 \pm 57,30 | 185,91 \pm 45,63 |

Fonte: Elaborado pela autora.

A tabela 3 ilustra os dados expressos em média \pm E.P.M. Após os diferentes tempos de abstinência à dieta palatável (24h e 7 dias), não houve diferença entre os grupos de intervenção neonatal no peso corporal, no acúmulo de gordura abdominal e nos níveis de corticosterona (ANOVA de duas vias, $P>0,05$).

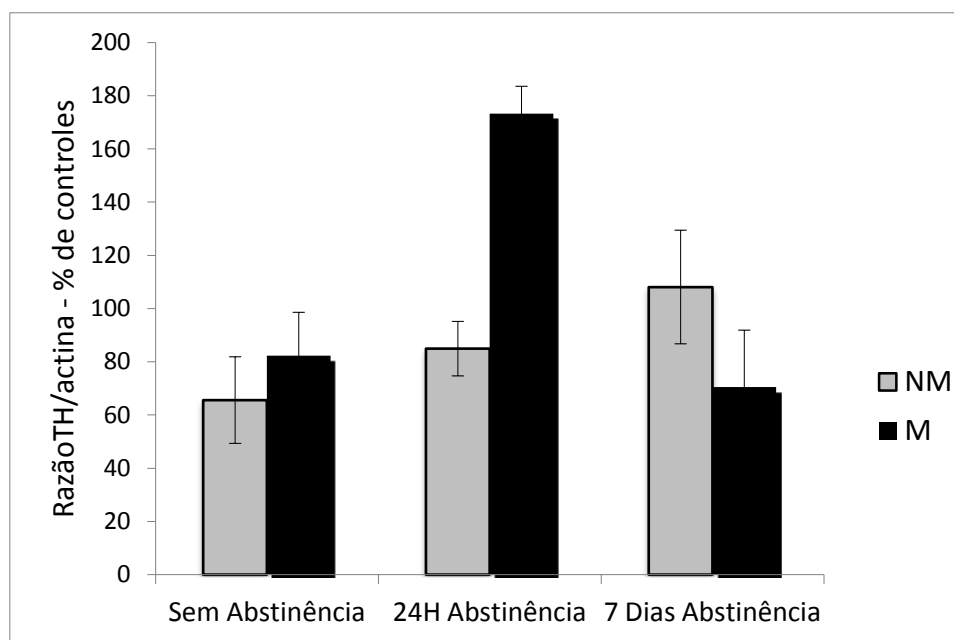
8.2.3 Análises neuroquímicas após 24 horas e 7 dias de abstinência à dieta palatável, em animais manipulados e não manipulados, no período neonatal, expostos a esse tipo de dieta por 15 dias na vida adulta.

8.2.3.1 Concentração de tirosina hidroxilase (th) na amígdala de ratas manipuladas e não manipuladas, expostas por 15 dias à dieta palatável, após 24 horas e 7 dias de privação desse tipo de dieta.

Após os diferentes períodos de abstinência (24h e 7 dias) à dieta palatável, a concentração de tirosina hidroxilase (TH) na amígdala foi determinada, através da técnica de Western Blotting, em ratas fêmeas

manipuladas e não manipuladas no período neonatal. Sendo a análise estatística realizada através da ANOVA de duas vias comparando os diferentes grupos e tempos de abstinência sobre a concentração de TH na amígdala não foi observado efeito do grupo de intervenção neonatal [ANOVA de duas vias, $F(5, 32)=1,679$, $P=0,206$], entretanto com efeito do tempo de abstinência [$F(5, 32)=3,682$, $P=0,046$] e também apresentou uma interação entre grupo e tempo de abstinência [$F(5, 32)=4,705$, $P=0,018$]. As análises de Pos hoc demonstraram que os animais manipulados que sofreram abstinência por 24 horas ao alimento palatável tiveram um aumento na concentração de TH na amígdala em comparação com os outros grupos, com exceção dos animais não manipulados no período neonatal e restritos à dieta palatável por 7 dias. A figura 12 mostra esses resultados.

Figura 12 - Gráfico da concentração de TH na amígdala de ratas sem abstinência, com abstinência por 24 horas e com abstinência de 7 dias à dieta palatável



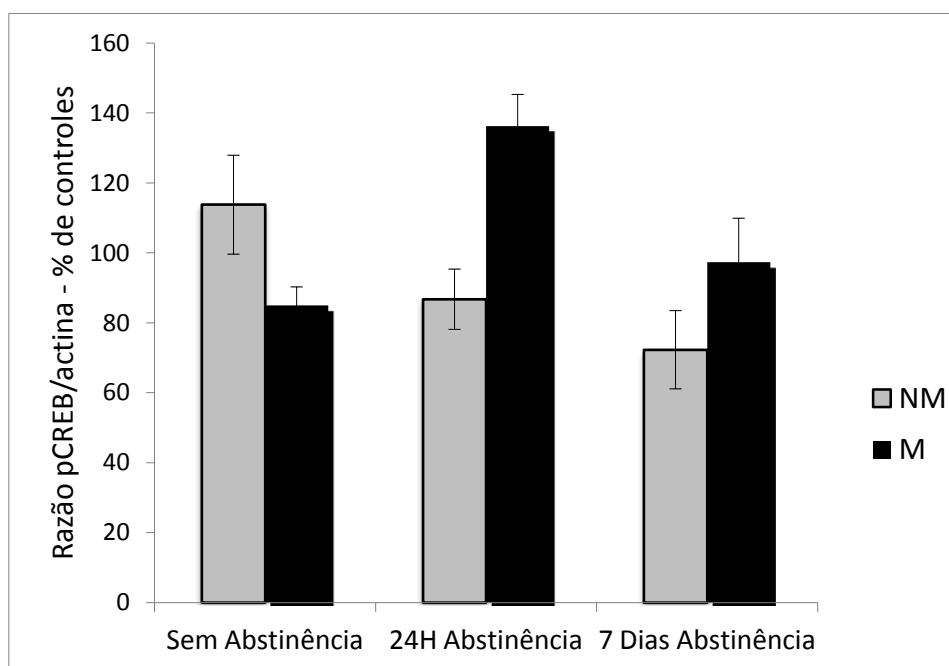
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 12: Concentração de TH na amígdala de ratas manipuladas (M, n=7) e não manipuladas (NM, n=5) no período neonatal, sem abstinência, com abstinência 24 horas e com abstinência 7 dias à dieta palatável. Dados expressos em média e \pm E.P.M. Sem efeito dos grupos de intervenção neonatal (ANOVA de duas vias, $P=0,206$) mas com efeito no tempo de abstinência (ANOVA de duas vias, $P=0,046$) e com interação entre grupo e tempo de abstinência (ANOVA de duas vias, $P=0,018$) na concentração da enzima.

8.2.3.2 Concentração de p-CREB na amígdala de ratas manipuladas e não manipuladas, expostas por 15 dias à dieta palatável, após 24 horas e 7 dias de privação desse tipo de dieta

A quantificação de p-CREB na amígdala também foi obtida pela técnica de Western Blotting em ratas fêmeas manipuladas e não manipuladas no período neonatal, após os diferentes períodos de abstinência (24h e 7 dias) à dieta palatável. Analisando cada um dos estratos de tempo de abstinência do alimento palatável (sem abstinência, 24h e 7 dias de abstinência), verificou-se que assim como a concentração de TH a presença de pCREB na amígdala também demonstrou uma interação entre grupo e tempo de abstinência [$F(5, 32)=7,676$ $P=0,002$], e apresentou um efeito isolado do tempo de abstinência [$F(5, 32)=3,567$ $P=0,042$], entretanto não teve efeito isolado do grupo de intervenção neonatal [$F(5, 32)=3,398$ $P=0,076$]. As análises de Pos hoc mostraram que os animais manipulados no período neonatal após uma restrição de 24 horas ao alimento palatável tiveram um aumento de pCREB em comparação com os ratos: não manipulados abstinentes 24 horas à dieta palatável (Tukey, $p=0,018$), manipulados sem abstinência ($p=0,006$) e aos não manipulados no período neonatal com restrição à dieta palatável por 7 dias ($p=0,001$). Além destes dados foram observadas outras diferenças na concentração de pCREB na amígdala. Estes achados são apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Gráfico da concentração de p-CREB na amígdala de ratas sem abstinência à dieta palatável



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13: Concentração de p-CREB na amígdala de ratas manipuladas (M, n=7) e não manipuladas (NM, n=5), no período neonatal, sem abstinência com abstinência 24 horas e com abstinência 7 dias à dieta palatável. Dados expressos em média \pm E.P.M. Sem diferença entre os grupos de manipulação neonatal na quantidade de p-CREB na amígdala (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$), mas com efeito isolado do tempo de abstinência (ANOVA de duas vias, $P = 0,042$) e foi observada uma interação entre grupo e tempo de abstinência (ANOVA de duas vias, $P = 0,002$).

9 DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente trabalho era avaliar se variações nas características da vida neonatal se associam a diferentes respostas comportamentais à abstinência de uma dieta palatável oferecida cronicamente na vida adulta, e os potenciais mecanismos envolvidos nessa resposta específica em fêmeas. De fato, averiguamos que, ao longo do tempo de exposição ao alimento palatável, e após a abstinência desta dieta, ocorreram variações no consumo entre os grupos, além de diferenças nas concentrações de TH e p-CREB na amígdala das ratas fêmeas estudadas.

No início deste estudo, foi realizada uma comparação entre os grupos de intervenção neonatal (manipulados e não manipulados) quanto ao número de filhotes por ninhada e no peso aos 60 e 90 dias, em que não foi observada diferença entre os grupos, conforme o esperado e semelhante ao encontrado na literatura (Silveira et al., 2004; 2006 e da Silva et al., 2007).

Constatou-se, no experimento 1, que independentemente do tempo de exposição, 15 ou 30 dias, o consumo calórico de dieta padrão aumentou, indiferente do grupo, manipulado ou não manipulado, no período neonatal. Já o consumo calórico de dieta palatável diminuiu durante os períodos de exposição crônica, 15 ou 30 dias, também não diferindo entre os grupos manipulados e não manipulados no período neonatal, conforme os estudos de Benetti et al. (2010). Apesar de não haver diferença estatística do consumo de dieta palatável entre os grupos, em média, os animais manipulados no período neonatal consumiram mais do que o grupo não manipulado. Esses achados são semelhantes aos de Benetti et al. (2007) e de Silveira et al. (2010), quando os animais são expostos a uma novidade; resultados parecidos com os encontrados no estudo de Marcolin et al. (2012).

As diferenças entre os achados do trabalho atual e dos anteriores do grupo e os achados de Marcolin et al. (2012) devem-se à diferença no tipo de dieta palatável oferecida. Enquanto nos estudos de Silveira et al. (2004) o alimento mais preferentemente usado era o Froot Loops, os estudos de Benetti et al. (2007) focalizaram o chocolate como alimento palatável. Já nas investigações de Marcolin et al. (2012), foi empregada uma dieta palatável em que a composição da ração era baseada em leite condensado.

É interessante notar que, de acordo com o recente estudo de Sharma et al. (2012), o consumo calórico de dieta palatável - quando esta é oferecida cronicamente, sem opção de dieta padrão - aumentou ao longo da exposição crônica. Isso sugere que, quando os animais são expostos cronicamente ao alimento palatável, juntamente com a exposição de uma dieta padrão, independentemente se sofreu ou não manipulação no ambiente neonatal, há um declínio do consumo calórico de alimento palatável durante a exposição, diferentemente de quando a exposição é exclusiva do alimento palatável.

O presente estudo também avaliou o ganho de peso corporal, no experimento 1, durante os 15 ou 30 dias de exposição crônica à dieta palatável. O peso aumentou ao longo do período de exposição a esta dieta, não diferindo entre o grupo manipulado e o não manipulado, resultado semelhante ao de Benetti et al. (2010), Sharma et al. (2012) e Ong et al. (2013). Possivelmente, o ganho maior de peso corporal ocorra por um consumo calórico mais elevado, pois os alimentos palatáveis são altamente calóricos, resultando em um maior ganho de peso pelos indivíduos expostos a estes alimentos do que pelos não expostos, independente do grupo neonatal.

Foi constatado, neste estudo, que o acúmulo de gordura abdominal, após a exposição crônica de 15 ou 30 dias ao alimento palatável, não diferiu entre os grupos de intervenção neonatal. Esse achado difere dos achados de Benetti et al. (2010), nos quais os animais manipulados no período neonatal apresentaram menor acúmulo de gordura abdominal ao final da exposição crônica ao chocolate. Novamente, diferenças na dieta oferecida podem ser responsáveis por estas discrepâncias, uma vez que o chocolate, apesar de ser rico em açúcar e gordura, possui antioxidantes e, portanto, poderia, de alguma maneira, ser protetor para o acúmulo de gordura abdominal, em especial em animais manipulados, ao contrário da dieta palatável (rica em açúcar e gordura).

Quando foi observado, nos achados já referentes ao experimento 2, o comportamento alimentar das ratas adultas após um período de abstinência ou não ao alimento palatável, foi possível constatar que os animais não manipulados se comportam semelhantemente ao descrito na literatura, com aumento do consumo de alimento palatável após a abstinência. Para comprovar isso, estudos realizados por Pankevich et al. (2010), que não têm a

presença da intervenção neonatal, relatam que a abstinência ao alimento palatável gera uma compulsão alimentar quando o mesmo é oferecido novamente. Outros autores relataram que a abstinência ao alimento palatável induz uma queda no peso corporal, como resultado de uma resposta fisiológica ao elevado estresse, associado à redução do estado de recompensa (SHARMA et al. 2012; BENETTI et al., 2010). No entanto, os animais manipulados, no período neonatal, que sofreram abstinência aguda (24 horas) da dieta palatável, diminuíram o consumo da mesma quando expostos a ela, diferentemente - mais uma vez - dos grupos que não sofreram restrição e dos que sofreram restrição por 7 dias. Portanto, esses animais se comportam de forma diferente dos não manipulados em resposta à abstinência, diminuindo o consumo em vez de aumentá-lo.

Este achado é interessante, uma vez que nosso grupo já demonstrou, em inúmeras situações, que estes animais apresentam maior consumo do alimento palatável em relação aos controles (SILVEIRA et al., 2004, 2005, 2006, 2008, 2010; BENETTI et al., 2007, 2010), que também está de acordo com o descrito por Marcolin et al. (2012), Bernardi et al. (2013) e Ferreira et al. (2013), porém é a primeira situação em que observamos MENOR consumo em relação aos animais não manipulados.

Esta diminuição do consumo não é acompanhada de aumento na corticosterona, portanto, não se deve relacionar a maior resposta ao estresse nesses animais. Além disso, sabe-se, a partir da literatura de Levine et al. (1967), Padoin et al. (2001) e vários outros pesquisadores, que a manipulação neonatal diminui a resposta a situações agudas e crônicas de estresse. Interessantemente, Benetti et al. (2010) haviam descrito que a abstinência aguda do chocolate induz maior perda de peso em animais manipulados no período neonatal, o que, provavelmente, se deve ao menor consumo alimentar, semelhantemente ao que foi visto neste trabalho (apesar de não encontrarmos diferença no peso corporal nos diferentes tempos de abstinência, desta pesquisa).

Segundo Sharma et al. (2012) e Benneti et al. (2007), o nível de corticosterona basal não é alterado pela dieta palatável. Entretanto, Sharma et al. (2012) relata que a retirada dessa dieta eleva os níveis de corticosterona no plasma, assim como Rabbani et al.(2009) descreve, referente à abstinência de

morfina, que também aumenta os níveis de corticosterona em roedores. Contudo, Gheibi et al.(2012) asseveram que, após o teste de formalina e abstinência de comida por períodos diferentes (12, 24 e 48 horas), os níveis de corticosterona em ratos machos não alteram.

No presente estudo, observou-se que, nos distintos períodos de abstinência (sem abstinência, 24 horas e 7 dias de abstinência ao alimento palatável), os níveis de corticosterona no plasma foram semelhantes entre os grupos, apresentando discreto aumento - não significativo - após 24 h de abstinência nos dois grupos neonatais. Isso sugere que a abstinência do alimento palatável é menos estressante para os animais quando a exposição crônica oferece duas opções de dieta (palatável + ração padrão), ponto no qual nosso protocolo difere do de Sharma et al. (2012).

Semelhante aos achados de Sharma et al. (2012), Pankevich et al. (2010) relatam que a resposta do eixo HPA ao estresse em animais que sofreram restrição calórica (porção restrita de dieta rica em açúcar e gordura por 21 dias), foi um aumento de corticosterona no plasma. Tomiyama et al.(2011) sugerem que a adaptação a longo prazo ao estresse crônico e alta densidade calórica resulta em uma maior deposição de gordura visceral (via ingestão de alimentos altamente palatáveis), esses alimentos modulam a resposta do eixo HPA, resultando em menor níveis de cortisol em mulheres.

É também importante ressaltar que esta alteração na resposta comportamental à abstinência em animais manipulados, diminuindo o consumo deste alimento após 24h de abstinência, foi acompanhada de aumento na concentração de tirosina hidroxilase e de pCREB na amígdala, o que também é um achado oposto ao que se vê em animais controle. De acordo com Sharma et al. (2012), a abstinência de uma dieta rica em gordura diminuiu a concentração de TH na amígdala, quando comparada à abstinência de uma dieta pobre em gordura. Esse autor sugere que o estresse está relacionado à abstinência e que, portanto, a diminuição da biossíntese de dopamina na amígdala poderia ter um papel na resposta de ansiedade e um aumento de corticosterona após a abstinência da dieta palatável (SHARMA et al., 2012). Essa diminuição da concentração de TH na amígdala também foi relatada por Jang et al. (2011), que sugere que, após o estresse, a expressão de TH na

amígdala, juntamente com o aumento dos níveis de glicocorticoides no soro, pode ser um importante biomarcador para sintomas de abstinência.

Apesar de nosso modelo não induzir alterações na corticosterona, ainda assim observa-se que o aumento no consumo do alimento palatável após abstinência é acompanhado de aumento de TH na amígdala em animais controle, sugerindo que a biossíntese de dopamina pode, independente da resposta ao estresse, ser um correlato da “recaída” após abstinência. Esses achados apontam que a manipulação neonatal pode ter um efeito protetor nesse caso. A interpretação mais importante deste achado é que observamos que uma intervenção neonatal aparentemente pequena é capaz de modular persistentemente a resposta comportamental e neuroquímica à abstinência do alimento palatável, o que pode ter implicações futuras para o desenvolvimento de outros estudos e, possivelmente, de estratégias de prevenção em humanos.

Em relação ao pCREB, Pandey et al. (1999) demonstrou que a concentração de P-CREB é mais baixa na amígdala de ratos que preferiam álcool do que de ratos que não preferiam o álcool, sugerindo que uma função diminuída de P-CREB na amígdala pode ser associada ao aumento da ansiedade e à preferência por substâncias aditivas. De acordo com Pandey et al. (2003), foi realizada a retirada de etanol após 15 dias de exposição e com isso diminuiu ainda mais a concentração de P-CREB na amígdala. Entretanto, já conforme Sharma et al. (2012), a exposição crônica à dieta palatável elevou a expressão de P-CREB na amígdala, embora a abstinência desse tipo de alimento tenha ocasionado uma redução da concentração de P-CREB na amígdala dos animais, semelhantemente ao que ocorreu em nossos animais controle.

Ainda de acordo com Sharma et al. (2012), o aumento da expressão P-CREB na amígdala contribuiria para a indução ao consumo de uma dieta palatável, e a diminuição de P-CREB na amígdala, durante a retirada do alimento palatável, aumentaria a resposta à recompensa por meio da comida. Relato semelhante foi averiguado em estudo que trata das reduções de P-CREB na amígdala após a retirada de nicotina, depois de um longo período de exposição (PANDEY et al., 2001). Com isso, Sharma et al. (2012) consideram que a diminuição da atividade de P-CREB na amígdala pode ser uma adaptação à abstinência de um alto teor de gordura, que orienta o

comportamento no sentido de restaurar a ingestão de alimentos palatáveis. Isso pode inculcar que os animais manipulados no período neonatal e expostos à abstinência da dieta palatável por um período agudo (24 horas) podem ser menos ansiosos, consumindo menor quantidade de dieta palatável.

As alterações bioquímicas estão ligadas à duração das alterações neuroquímicas e comportamentais concernentes à função dopaminérgica e aos resultados paralelos obtidos durante administração crônica de drogas de abuso e sua abstinência (SHARMA et al., 2012). Com isso, a presente investigação sugere que a manipulação no ambiente neonatal pode ter um efeito protetor, podendo ser fundamentado a partir das alterações bioquímicas e neuroquímicas, aumentando a expressão de TH e P-CREB na amígdala de ratas fêmeas adultas em resposta à abstinência do alimento palatável oferecido cronicamente.

10 CONCLUSÃO

Baseado na hipótese de que a manipulação neonatal induziria uma resposta comportamental e neuroquímica à abstinência do alimento palatável após a sua exposição crônica, concluiu-se que as variações do ambiente neonatal podem ter uma influência na resposta à abstinência aguda da dieta palatável, principalmente neuroquímica, aumentando a presença TH e p-CREB na amígdala dos indivíduos que sofreram essa restrição por 24 horas. Entretanto, mais estudos deverão ser realizados no intuito de esclarecer se existem mais efeitos bioquímicos e neuroquímicos ocasionados pela abstinência de alimentos palatáveis e se o modelo de manipulação neonatal realmente protege os indivíduos dessas alterações. Esses resultados, posteriormente, poderão ser utilizados em benefício dos humanos.

REFERÊNCIAS

- ADER, R; GROTA, L. J. Effects of early experience on adenocortical reactivity. **Physiol Behav.** 1969; 4:303-5.
- AVENA, N. M; RADA, P.; HOEBEL, B. G. Sugar and Fat Bingeing Have Notable Differences in Addictive-like Behavior. **The Journal of Nutrition.** January 28. (2009); doi: 10.3945/jn.108.097584.
- ADINOFF, B. The alcohol withdrawal syndrome: neurobiology of treatment and toxicity. **Am J Addict.** 1994;3:277–288.
- AYRES, C. et al. Intrauterine Growth Restriction and the Fetal Programming of the Hedonic Response to Sweet Taste in Newborn Infants. **Int J Pediatr.** 2012; 657379. PubMed PMID: 22851979. PubMed Central PMCID: PMC 3407636.
- BAIK, J.-H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits.** October 2013. (7): Article 152.
- BARBIERI, M. A. et al. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. **Pediatr. Res.** 65:215-220.
- BERNARDI, J.R. et al. Early Life Stress Interacts with the Diet Deficiency of Omega-3 Fatty Acids during the Life Course Increasing the Metabolic Vulnerability. **Adult Rats.** 2013. PLoS ONE 8(4): e62031. doi:10.1371/journal.pone.0062031
- BLUML, V. et al. Relationship between substance use and body mass index in young males. 2012. **Am J Addict** 21:72-77.
- BRAKE, W.G. et al. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. **Eur J Neurosci.** 2004; 19:1863-74.
- BRENSEKE, B. et al. Current Thoughts on Maternal Nutrition and Fetal Programming of the Metabolic Syndrome. **Journal of Pregnancy.** Vol. 2013, Article ID 368461, 13 pages.
- CALDJL, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Neurobiology.** 1998. Vol. 95, pp. 5335-5340.
- COLANTUONI, C. et al. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. **Obes Res.** 2002;10:478-488.
- COTTONE, P. et al. CRF system recruitment mediates dark side of compulsive eating. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009. November 24; 106(47): 20016-20020.

DALLMAN, M. F., et al. Chronic stress & obesity: a new view of comfort food. *Proc.Soc. Natl.* 2003. **Acad. Sci. USA.** 100: 11696-11701.

DALLMAN, M. F.; PECORARO, N. C., LA FLEUR, S. E. Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. *Brain, Behavior and Immunity.* 19 (2005) 275-280

DA SILVA BENETTI, C. et al. Neonatal environmental intervention alters the vulnerability to the metabolic effects of chronic palatable diet exposure in adulthood. 2013. **Nutritional Neuroscience.** DOI: 10.1179/1476830513Y.00000000 77.

DA SILVA BENETTI, C. et al. Effects of a chronic exposure to a highly palatable diet and its withdrawal, in adulthood, on cerebral Na⁺,K⁺-ATPase and plasma S100B in neonatally handled rats. **Int J Dev Neurosci.** 2010; 28:153-9.

DA SILVA BENETTI, C. et al. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? **Pediatr Res.** 2007; 62:405-11.

DAVIS, J. F. et al. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. 2008. **Behav Neurosci.** 122:1257-1263.

DAVIS, J. F.; CHOI, D.L.; BENOIT, S. C. Insulin, leptin and reward. 2010. **Trends Endocrinol Metab,** 21:68-74.

DILEONE, R. J.; TAYLOR, J. R.; PICCIOTTO, M. R. The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. **Nature Neuroscience.** 2012; 15:1330-1335.

DUNN, J. P. et al. Relationship of dopamine type 2 receptor binding potential with fasting neuroendocrine hormones and insulin sensitivity in human obesity. **Diabetes Care.** 2012; 35: 1105-1111.

FERREIRA, C. F. et al. Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** v. 107, p. 11-19, 2013.

FRANCIS, D. D. et al. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. **Annals New York Academy of Sciences.** 1996; 794:136-52.

GHEIBI, N. et al. The Effect of Food Deprivation on Nociception in Formalin Test and Plasma Levels of Noradrenaline and Corticosterone in Rats. **Basic and Clinical Neuroscience.** 2013; 4(4), 63-69.

GLUE, P.; NUTT, D. J. Overexcitement and disinhibition: dynamic neurotransmitter interactions in alcohol withdrawal. **Br J Psychiatry**. 1990; 157:491-499.

INADERA, H. Developmental origins of obesity and type 2 diabetes: molecular aspects and role of chemicals. **Environ Health Prev Med**. 2013; 18:185-197.

JANG, S. et al. Modulation of sphingosine 1-phosphate and tyrosine hydroxylase in the stress-induced anxiety. **Neurochemical Research**. 2011; 36(2), 258-267.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Rev Bras Psiquiatr**. 2004; 26(3):189-201.

KAYE, W. H. et al. Does a Shared Neurobiology for Foods and Drugs of Abuse Contribute to Extremes of Food Ingestion in Anorexia and Bulimia Nervosa? **Biol Psychiatry**. 2013;73:836-842

KING, W. C. et al. Prevalence of alcohol use disorders before and after bariatric surgery. **JAMA**. 2012; 307: 2516-2525.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. 2005. **Nat Neurosci**. 8:1442-1444.

LENT, M. R.; SWENCIONIS, C. Addictive personality and maladaptive eating behaviors in adults seeking bariatric surgery. **Eat Behav**. 2012; 13: 67-70.

LEVINE, S. et al. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiol Behav**. 1967; 2:55-9.

LEVINE, A. S.; KOTZ, C. M.; GOSNELL, B. A. Sugars and fats: the neurobiology of preference. **J Nutr**. 2003;133:831S-834S.

LIU, D. et al. Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary Adrenal Responses to Stress. 1997. **Science**. 277: 1659.

LUCION, A. B. et al. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. **Behav Neurosci**. 2003; 117:894-903.

MARCOLIN, M. L. et al. Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. **Physiology & Behavior**, v. 106, p. 491-498, 2012.

MEANEY, M. J. et al. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. **Neuroendocrinology**. 1989; 50:597-604.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**. 1996;1(4):336.

ONG, Z. Y. et al. Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. **Appetite**. 2013 Jun;65:189-99.

PADOIN, M. J. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. 2001. **Behav. Neurosci**. 115, 1332-1340.

PALMITER, R. D. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: Lessons from dopamine-deficient mice. 2008. **Ann N Y Acad Sci**. 1129:35-46.

PANAGIOTAROPOULOS, T. et al. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. **Neuroendocrinology**. 2004; 79:109-18.

PANDEY, S. C. et al. Potential role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety. 1999a. **J Pharmacol Exp Ther**. 288:866-878.

PANDEY, S. C. et al. Involvement of the cyclic AMP responsive element binding protein gene transcription factor in genetic preference for alcohol drinking behavior. 1999b. **Alcohol Clin Exp Res**. 23:1425-1434.

PANDEY, S. C. et al. Effects of protracted nicotine exposure and withdrawal on the expression and phosphorylation of the CREB gene transcription factor in the rat brain. 2001a. **J Neurochem**. 77:943-952.

PANDEY, S. C.; ROY, A.; ZHANG H. The Decreased Phosphorylation of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Response Element Binding (CREB) Protein in the Central Amygdala Acts as a Molecular Substrate for Anxiety Related to Ethanol Withdrawal in Rats. 2003. **Alcohol Clin Exp Res**. 27(3):396-409.

PANKEVICH, D. E. et al. Caloric restriction experience reprograms stress and orexigenic pathways and promotes binge eating. 2010. **J Neurosci**. 30(48):16399-16407.

PECORARO, N. et al. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. 2004. **Endocrinology**. 145: 3754-3762.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress induced release in adult rats. **Mol Br Res**. 1992; 18:185-200.

PORTELLA, A. K. et al. Effects of in utero conditions on adult feeding preferences. 2012. **J of Dev Origins of Health and Disease**. 3, 140-152.

RABBANI, M. et al. Increases in brain corticosterone concentration and recognition memory impairment following morphine withdrawal in mice. **Stress**. 2009; 12(5): 451-456.

REN, X. et al. Alterations in phosphorylated CREB expression in different brain regions following short- and long- term morphine exposure: relationship to food intake. **J of Obesity**. 2013; 2013:1-11.

SHARMA, S. et al. Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal. **Int J of Obesity**. 2012; 1–9.

SILVEIRA, P. P. et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. **Physiol Behav**. 2004; 80:739-45.

SILVEIRA, P. P. et al. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **Int J Dev Neurosci**. 2005a;23(1):93-9.

SILVEIRA, P. P. et al. Satiety assessment in neonatally handled rats. **Behav Brain Res**. 2006; 173:205-10.

SILVEIRA, P. P. et al. Origens desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD). **J Pediatr (Rio J)**. 2007;83(6):494-504.

SILVEIRA, P. P. et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. **Int J Dev Neurosci**. v. 28, p. 111-118, 2010.

SILVEIRA, P. P. et al. Association between Na⁺,K⁺-ATPase activity and the vulnerability/resilience to mood disorders induced by early life experience. **Neurochemical Research**. v. 36, p. 2075-2082, 2011.

SILVEIRA, P. P. et al. On behalf of the Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment (MAVAN) Study Team. Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. **Pediatric Research**. 2012; 71 (3):293-298.

SILVEIRA, P. P. et al. Levitan on behalf of the MAVAN Study Team. (2014): Association between the seven-repeat allele of the dopamine-4 receptor gene (DRD4) and spontaneous food intake in pre-school children. **Appetite**. 73: 15-22

SIMON, G. et al. Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population. 2006. **Arch Gen Psychiatry**. 63:824-830.

SOTO, N. et al. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. **J Clin Endocrinol Metab**. 2003; 88:3645-50.

THANOS, P. K. et al. Food restriction markedly increases dopamine D2 receptor (D2R) in a rat model of obesity as assessed with in-vivo muPET imaging ([¹¹C] raclopride) and in-vitro ([³H] spiperone) autoradiography. **Synapse**. 2008; 62: 50-61.

TOMIYAMA, A. J. et al. Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. **Psychoneuroendocrinology**. 2011; 36(10), 1513-1519.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J of Psychosomatic Research**. 53 (2002) 865-871.

VOLKOW, N. D.; O'BRIEN, C. P. Issues for DSM-V: should obesity be included as a brain disorder? **Am J Psychiatry**. 2007; 164: 708-710.

VOLKOW, N. D. et al. Obesity and addiction: Neurobiological overlaps. 2013. **Obes Rev**. 14:2-18.

VOLKOW, N. D. et al. The Addictive Dimensionality of Obesity. **Biol Psychiatry**. 2013;73:811-818.

WORLD Health Organization [homepage on the Internet]. **Obesity and overweight. Fact sheet** n. 311. [updated DECEMBER]; [about 4 screens]. Available from: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.