

Redução da Reatividade ao Sabor Doce em ratas fêmeas juvenis manipuladas no período neonatal: Recuperação na Fase Adulta

André de N.D. Benitz, Luisa A. Diehl, Eduardo V. P. Toigo, Ana P. Huffel, Rachel Krolow, Cristie Noschang, Carla Dalmaz*

Laboratório de Neurobiologia do Estresse, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre, RS, Brasil

Resumo

Ratos manipulados na fase neonatal apresentam maior consumo de alimento doce na vida adulta, e uma alteração no componente hedônico desse comportamento poderia explicar esses achados. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre a reação facial afetiva quando da ingestão de soluções de sacarose em ratos fêmeas juvenis e adultas. Visando avaliar a responsividade na fase pré-púbere e adulta, acompanhando as flutuações hormonais do ciclo estral e avaliando a influência deste sobre o teste. O protocolo de manipulação neonatal foi realizado dos dias 1 a 10 de vida, sendo o dia do nascimento considerado dia 0. Os animais foram colocados em um recipiente dentro de incubadora a 32°C por 10 min/dia, na mesma sala que a mãe, porém, sem contato físico. Foi realizado um teste de reatividade ao sabor, que consiste de filmagens das expressões faciais do animal em resposta a administração oral de solução, foram utilizadas soluções de duas concentrações de sacarose (0,1M e 1M). Os testes foram realizados em duas idades, com animais diferentes, iniciando aos 28 dias e 60 dias. Os resultados revelaram menor responsividade hedônica positiva (quantidade total de protrusões de língua) para animais manipulados de 28 dias para a solução de 0,1M, quando comparados com grupo não-manipulado. Não houve diferença significativa nos demais testes. Adicionalmente, a quantificação da enzima tirosina hidroxilase não revelou diferença significativa, comparando animais manipulados e não-manipulados. Os resultados indicam menor sensibilidade para o sabor doce nos animais manipulados no período neonatal quando testados na fase juvenil, com recuperação desse efeito na fase adulta.

Palavras-chave: Manipulação Neonatal; Teste de Reatividade ao Sabor; Dopamina; Ciclo Estral

*Fones: +55-51-3308 5570/3308 5569; Fax: +55-51-3308 5540. *E-mail:* cdalmaz@ufrgs.br (C. Dalmaz).

Physiology & Behavior

Official journal of the International Behavioral Neuroscience Society
Copyright © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introdução

Está bem estabelecido que as respostas do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) a estímulos estressores apresentam características distintas em cada organismo, tais variações interindividuais podem ser originadas de fatores genéticos [1,2]. Porém, existem evidências de que a reatividade a estresse na idade adulta pode resultar de fatores no desenvolvimento precoce [3,4]. O desenvolvimento de um determinado comportamento resulta de interações genéticas e ambientais que influenciam uma série de mecanismos. Acontecimentos no período neonatal, como os estímulos estressantes, podem alterar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto [5]. Vários estressores ou mudanças ambientais na infância têm sido associados a sérios problemas psiquiátricos na vida adulta, como ansiedade, depressão e transtornos alimentares [6,7]. Em humanos, a falta de toque dos pais no início da infância tem sido considerada como um aspecto importante no desenvolvimento de imagem corporal própria, conseqüentemente, na causa de transtornos alimentares [8]. As interações entre mãe e filho são muito importantes no crescimento psicológico, comportamental e para o desenvolvimento na infância, especialmente na resposta ao estresse do ambiente [9,10].

Diversos estudos com modelos animais comprovaram que qualquer estimulação feita com o filhote no período neonatal, pode desencadear um comportamento diferente da mãe em relação ao filhote. Os filhotes manipulados (separados brevemente das mães na fase neonatal) recebem mais lambidas, mais *grooming* e amamentação mais frequente, do que os filhotes não manipulados [11-13]. Estudos antigos demonstraram aumento das vocalizações ultrasônicas dos filhotes durante o procedimento de manipulação [11,14], o que poderia desencadear o comportamento materno após a intervenção. Alguns autores relatam que filhotes criados por mães que demonstram altos níveis de comportamento materno ou expostos a procedimentos de manipulação [13,15,16] mostram diminuição no comportamento do tipo ansioso na idade adulta [17-19]. Outros estudos tem mostrado que variações no comportamento do cuidado materno produzem marcadas modificações fisiológicas [13,15,18,20] e comportamentais, incluindo respostas emocionais [21-23] na ninhada adulta. Esse comportamento diferenciado da mãe é um importante fator para o desenvolvimento neural dos filhotes [24].

Durante a fase neonatal o eixo HPA apresenta um padrão de atividade característico, denominado de Período de Hiporresponsividade ao Estresse [25]. Nesta fase, há uma diminuição da resposta do eixo HPA aos estímulos nocivos [26,27]. Essa diminuição é caracterizada pela exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides na hipófise e pela diminuição da sensibilidade da glândula adrenal ao ACTH [28]. Animais que sofreram manipulação neonatal, quando adultos, demonstram menor elevação e maior resiliência aos níveis basais de corticosterona plasmática em resposta a estressores [29-31]. Entretanto, animais manipulados e não-manipulados apresentam níveis basais semelhantes de corticosterona, ou seja, a diferença parece estar em uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central ao sistema de retroalimentação negativa da adrenal [24], sendo que foi reportado um elevado número de receptores de glicocorticóides nesses animais [3]. Em animais adultos previamente submetidos à manipulação neonatal, foi observada uma maior concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo [32] e uma diminuição da excitação mediada pela amígdala na resposta do eixo HPA [33]. Estudos demonstraram persistência das alterações do eixo HPA em ratos de 24 e 26 meses [9,34]. A manipulação neonatal aumenta a expressão de receptores para hormônio liberador de

corticotropina (CRH) e $\alpha 2$ adrenorreceptores na amígdala e no locus ceruleus, regiões importantes para a resposta ao medo [17], assim como para glicocorticóides no hipocampo e no córtex frontal, envolvidos na regulação da atividade do eixo HPA [35]. Outros sistemas envolvidos em efeitos de redução da ansiedade, GABAérgico e benzodiazepínico, apresentam número de receptores aumentados em animais manipulados [36,37]. Estudos mostram que filhotes de mães mais cuidadoras (maior frequência de lambidas e *grooming*) apresentam resposta reduzida do eixo HPA ao estresse [13], acompanhado por maior atividade exploratória, o que é interpretado como uma resposta de medo atenuada a ambientes novos [29,30], e alterações no comportamento sexual [38]. A manipulação neonatal dos filhotes desencadeia a liberação de hormônios da tireóide, o que leva a um aumento na liberação de serotonina em diversas regiões do encéfalo [34,37,39]. Isto não parece persistir até a idade adulta, mas deve gerar alterações no desenvolvimento de outros sistemas. Camundongos da linhagem BALB/ cByJ, que apresentam maior hipersecreção de ACTH e corticosterona em resposta ao estresse por choque nas patas agudo ou crônico [40,41], quando expostos a manipulação neonatal, demonstraram atenuação no prejuízo de desempenho característico da linhagem no labirinto aquático de Morris [3], possivelmente por atenuação da atividade do eixo HPA.

O protocolo de intervenção neonatal também demonstrou alterações sobre o comportamento alimentar, nos animais adultos. Animais manipulados no período neonatal ingerem mais alimento palatável na idade adulta comparados aos animais controle, quando expostos a este em aparato de teste [42-44] ou caixa-moradia [45], sem apresentar diferença no consumo de ração padrão. Na tarefa de comportamento alimentar, animais machos manipulados, na fase pré-púbere apresentaram menor consumo de alimento doce, em comparação com grupo controle; porém, na fase adulta o efeito da manipulação foi inverso, apresentando maior consumo em comparação com os animais controle [45].

Os alimentos doces são uma recompensa natural e tem importantes propriedades motivacionais, sendo utilizados em diversas tarefas comportamentais como reforço [43-45]. É sabido que beber sacarose aumenta os níveis de dopamina no núcleo accumbens e uma relação quantitativa foi demonstrada entre o efeito concentração-dependente da percepção pelo paladar da sacarose durante a alimentação e o fluxo aumentado de dopamina no accumbens [46]. A dopamina no núcleo accumbens parece interferir na busca ou modular o incentivo percebido da recompensa [47]. Respostas a alimentos palatáveis aumentam o disparo de neurônios dopaminérgicos, especialmente quando a recompensa não é esperada [48,49]. Respostas a drogas também envolvem ativação dopaminérgica [50,51]. A manipulação neonatal está relacionada a alterações no metabolismo dopaminérgico: já foi relatado um aumento do metabolismo dopaminérgico no hipotálamo [52], assim como uma reduzida neurotransmissão da dopamina no núcleo accumbens [53].

O prazer no consumo de alimento doce é uma resposta normal, gera a sensação de gostar. “Gostar”, é essencialmente uma resposta hedônica ao prazer de uma recompensa. Diferente de “Querer”, que envolve o valor potencial de uma recompensa, a saliência de incentivo [54]. Perdendo a habilidade de ativar o sistema de “gostar”, o doce perde a resposta de prazer, apesar de continuar possuindo o sabor doce. Estudos demonstram aversão a sabor doce por pareamento a enjoô [55], o contrário também ocorre, na associação de sabores amargos à recompensa gerada (e.g. café, cerveja) [54]. O estudo de reatividade a sabores, por avaliação das respostas faciais evocadas por sabores diferentes, tem sido um modelo muito interessante para o estudo de respostas hedônicas. Estas respostas faciais são conservadas ao longo da escala evolutiva, apresentando padrões muito semelhantes de roedores a primatas, humanos e não-humanos [56,57]. Isto aumenta a confiabilidade dos modelos animais, e permite estudos de manipulação em sistemas neurais que são eticamente inviáveis em humanos. Por tratar-se de um procedimento forçado os animais podem ser mantidos com alimento e água *ad libitum*, evitando qualquer possível efeito da privação alimentar sobre a percepção gustatória.

Adicionalmente, estudos comportamentais de responsividade ao sabor, em ratos, revelaram diferença sexual na preferência ao sabor, assim como flutuações na preferência e acuidade, relacionadas com as alterações naturais dos níveis hormonais que ocorrem durante o ciclo estral e gravidez [58,59]. Essas observações sugerem que hormônios gonadais, como o estradiol, podem modular a responsividade ao sabor em ratos, via mecanismos organizacionais e ativacionais. Ratas fêmeas demonstraram flutuações na frequência e quantidade das refeições, que variaram com as diferentes fases do ciclo estral [60]. Hormônios gonadais, especialmente o estradiol, parecem ser responsáveis por diferenças sexuais no comportamento alimentar em ratos. Por exemplo, a administração central ou periférica de estradiol reduz a ingestão de alimento [61,62]; no entanto, o estradiol também pode apresentar efeitos de redução do consumo de alimento doce [63]. Adicionalmente, ovariectomia resulta em aumento do consumo alimentar, o que é revertido pela administração de estradiol. Durante o ciclo estral o consumo alimentar é aumentado quando o estradiol apresenta níveis basais (e.g. metaestro) e reduzido quando o estradiol apresenta níveis altos (e.g. proestro) [64,65]. As flutuações hormonais também influenciam a preferência por sabores nas fêmeas [66]. Obviamente, a caracterização desses sabores é baseada na percepção humana. Está bem estabelecido que ratos apresentam uma diminuição de 20-40% no consumo alimentar durante o estro, comparado com diestro e proestro [67-71]. Apesar de as mulheres serem mais sensíveis a transtornos no comportamento alimentar do que homens [72,73], a grande maioria dos estudos com modelos animais são realizados em machos [74,75].

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da manipulação neonatal sobre as respostas faciais hedônicas, no teste de reatividade ao sabor doce em ratas. O teste foi realizado em duas idades distintas, jovens e adultas, nestas últimas acompanhando as variações do ciclo estral. E para avaliação da atividade do sistema dopaminérgico foi analisado o imunocntéudo de tirosina hidroxilase no núcleo accumbens, uma enzima essencial do metabolismo dopaminérgico.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Todos procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional e seguiu as recomendações do *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS), e da Federação de Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental. Todos esforços foram realizados para minimizar o sofrimento animal, assim como reduzir o número de animais utilizados.

Vinte e duas ratas prenhes criadas em nosso próprio biotério foram aleatoriamente selecionadas. Elas foram mantidas sozinhas em caixas-moradia de Plexiglas (65x25x15cm), com assoalho coberto por maravalha e mantida em ambiente controlado: fonte luminosa ligada das 7:00 até 19:00 h, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, troca de maravalha duas vezes semanais, comida e água provida *ad libitum*. O dia de nascimento foi considerado dia 0. Todas ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes e mantidas intactas até o dia do desmame, a não ser para o protocolo de manipulação neonatal, que foram realizados entre 10:00 e 15:00 h. Os pesquisadores trocavam de luvas entre os procedimentos de manipulação de cada ninhada, evitando que o odor das ninhadas se espelha-se de ninho para ninho. As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no 21º dia pós-natal. Não mais de 2 animais por ninhada foram utilizados nas tarefas comportamentais e somente 1 para os procedimentos bioquímicos. Somente fêmeas foram utilizadas neste trabalho.

2.2 Manipulação Neonatal

As ratas Wistar prenhes foram aleatoriamente divididas em dois grupos.

Não-manipulado (C): Os animais foram mantidos intactos, na presença de suas mães, do dia do nascimento até o desmame. Os técnicos do biotério foram instruídos a não encostar nos animais, nem mesmo para limpeza das caixas-moradia. O próprio pesquisador ficou responsável pela limpeza. A maravalha suja era cuidadosamente removida no entorno do ninho, evitando perturbar os filhotes e a mãe, e substituída por maravalha limpa.

Manipulado (M): A rata mãe era gentilmente puxada para o lado da caixa oposto ao ninho, enquanto que os filhotes foram removidos e colocados em um recipiente limpo com um pouco de maravalha do seu próprio ninho. Esse recipiente foi colocado em uma incubadora a temperatura ambiente ($30\text{-}32^\circ\text{C}$). Após 10 min os animais foram recolocados aos cuidados de suas mães. Este procedimento durou dos dias 1 a 10 seguintes ao nascimento. Após este período os animais foram mantidos sem distúrbios até o 21º dia de vida (desmame). Os técnicos do biotério foram instruídos a não encostar nos animais, nem mesmo para limpeza das caixas-moradia. O mesmo procedimento de limpeza do grupo C foi utilizado para estes animais.

2.3 Teste de Reatividade ao Sabor

O teste de reatividade ao sabor foi realizado em duas idades, iniciando aos 28 dias de vida e na idade adulta, aos 60 dias. No 1º dia os animais foram colocados sobre um espelho (30cmx25cm) por 1 min, para fins de habituação. Durante os cinco dias seguintes, um volume de 100µl de água era administrada na boca do animal, utilizando-se uma pipeta com ponteira plástica. Após esses 5 dias de habituação, a sessão de teste foi realizada: foram administradas soluções de sacarose (0,1M e 1M, com intervalos de 30 min entre administrações). As expressões faciais hedônicas foram registradas com câmera digital para posterior análise durante 1 min. Em outros grupos de animais M e C das mesmas ninhadas, o ciclo estral foi acompanhado diariamente a partir dos 60 dias, e somente animais com 2 ciclos regulares foram utilizados. Ao final do teste, a fase do ciclo estral foi avaliada para relacionar com a análise do comportamento. Os animais tinham livre acesso a ração e água durante os experimentos. Foram analisadas as expressões faciais hedônicas positivas de protrusão de língua rítmicas e laterais. O comportamento foi analisado quadro a quadro no software KM Player®, cegos ao tratamento de manipulação neonatal, e expressos em número de quadros totais e frequência de protrusão (1 quadro = 1/30s). Adaptado de Berridge [57]. Este comportamento envolve a análise de um comportamento conservado na escala evolutiva, o comportamento de lambear os lábios após consumo de alimentos palatáveis, observado de roedores a primatas [56,57].

2.4 Avaliação do Ciclo Estral

Os animais eram retirados da caixa-moradia, e gentilmente manuseados para que ficassem calmos, de forma a evitar que estes se machucassem durante o procedimento. Então, uma pipeta Pasteur, contendo 100 µl de solução fisiológica (0,9%), era gentilmente introduzida na entrada da vagina do animal. A solução era dispensada dentro do canal vaginal, e recuperada por diferença de pressão na pipeta. A amostra era colocada em lâmina de vidro e imediatamente analisada em microscópio óptico, para determinação da fase do ciclo estral. A fase do ciclo foi determinada conforme as seguintes características: Diestro 1, presença de leucócitos e algumas células queratinizadas; Diestro 2, presença de grande quantidade de leucócitos e pequeno número de células; Proestro, presença de células queratinizadas e células nucleadas; Estro, grande quantidade de células queratinizadas [76]. Este procedimento foi realizado durante dois ciclos completos das fêmeas, somente animais com ciclos regulares foram utilizados. Após o Teste de Reatividade ao Sabor o ciclo das fêmeas também foi avaliado, evitando interferência de estresse no procedimento sobre o teste.

2.5 Western Blot

Para os estudos de imunoblot, os animais (controles e manipulados) foram decapitados, o encéfalo foi removido e o accumbens dissecado, o tecido foi congelado a -70°C até a utilização ($n=4-5/\text{grupo}$). As amostras de proteína foram preparadas por homogeneização em tampão de lise contendo Hepes 10 mM, KCl 2.5 M, EDTA 0.6 mM (pH 7.9), PIC 1%, e dodecil sulfato de sódio 1% (SDS). Alíquotas foram retiradas de acordo com determinação da concentração de proteína, e β -mercaptoetanol foi adicionado a uma concentração final de 5%. Amostras contendo 50 mg de proteína foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Depois de eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas a uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 2h com leite em pó 5% em Tampão Tris-Salino (TBS) mais Tween-20 1%, seguido de incubação *overnight* a 4°C com anti- Tirosina Hidroxilase (diluição 1:500, anticorpo policlonal de coelho, Millipore®) diluído na mesma solução de bloqueio. Subsequentemente, as membranas foram incubadas por 2h com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anticorpo *anti-rabbit*) diluído na mesma solução de bloqueio (1:1000). Todos blots foram reincubados com anticorpo β -actina (diluição 1:2500, anticorpo monoclonal de camundongo, Sigma®) como um controle interno. Bandas imunorreativas foram reveladas por um Kit amplificador de quimioluminescência (ECL Amersham da GE Healthcare®), e detectados utilizando filme de raio-x. Os filmes de imunoblot foram escaneados e a imagem digital analisada com software Optiquant (Packard Instrument®).

2.6 Sacrifício e Dissecção de Estruturas

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por guilhotinamento, seguindo normas determinadas pelo comitê de ética da nossa Universidade. O encéfalo foi coletado e o núcleo accumbens dissecado para posterior análise bioquímica.

2.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, e foram analisados por Teste *t* de Student (quadros totais x concentração da solução de sacarose, frequência total de protrusões x concentração da solução de sacarose; manipulados x não-manipulados), Anova de Duas Vias (teste de reatividade ao sabor; grupo x fase do ciclo estral). O nível de significância foi tido como diferente quando o valor de *P* era igual ou menor a 0,05. O tamanho amostral adequado foi baseado em outros artigos publicados envolvendo os procedimentos utilizados neste trabalho, [77,78].

3. Resultados

3.1 Teste de Reatividade ao Sabor

Nos animais jovens (28 dias) foi observado um menor número de quadros totais de respostas hedônicas afetivas (Fig. 1) em resposta à sacarose. Na concentração de 0,1M de sacarose, a média \pm erro padrão da média para o grupo C foi de $45,0 \pm 4,4$, e para o grupo M $30,7 \pm 4,7$, obtendo um valor de $P=0,04$. Nos testes com a solução de sacarose 1M não houve diferença estatística significativa, $t(23)= 0,36$, $P>0,1$. A avaliação da frequência do comportamento de protrusão de língua (Fig. 2) não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos, tanto para a solução de sacarose 0,1M (Teste t , $t(23)=1,85$, $p=0,078$) quanto para a solução de sacarose 1M (Teste t , $t(23)= 0,15$, $P>0,1$).

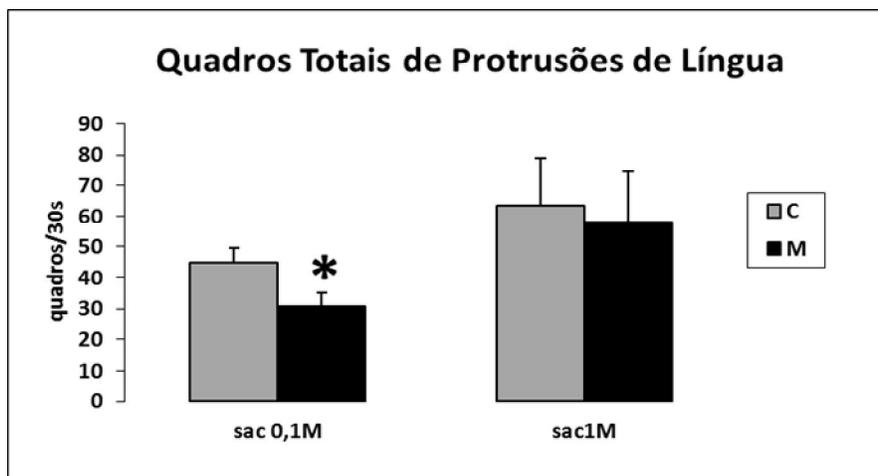


Fig. 1: Respostas afetivas à solução de sacarose em diferentes concentrações em ratos de 28 dias – solução de sacarose 0,1M [Teste t , $t(23)=2,18$, $p=0,04$, média \pm E.P.M, C= 45.0 \pm 4.4 e M = 30.7 \pm 4.7] ; sacarose 1M [Teste t , $t(23)= 0,36$, $P>0,1$].

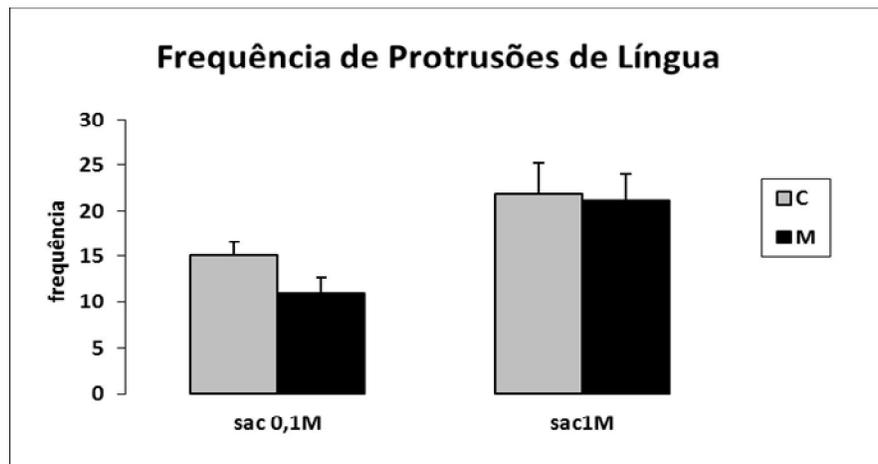


Fig. 2: Respostas afetivas à solução de sacarose em diferentes concentrações em ratos de 28 dias – solução de sacarose 0,1M [Teste t , $t(23)=1,85$, $p=0,078$]; sacarose 1M [Teste t , $t(23)= 0,15$, $P>0,1$].

Nos animais adultos (60 dias), para a solução de sacarose 0,1M, uma ANOVA de duas vias utilizando o ciclo estral e a manipulação neonatal como fatores, não demonstrou diferença estatística significativa, tanto para quadros totais de expressões faciais positivas (Fig. 3: manipulação, $F(1,21) = 1.80$; ciclo estral: $F(2,21) = 0.06$; $P > 0.05$), quanto para frequência de protrusões de língua (Fig. 4: manipulação: $F(1,21) = 1.35$; ciclo estral: $F(2,21) = 0.08$; $P > 0.05$). Também não houve diferença estatisticamente significativa para a solução de sacarose 1M, tanto para quadros totais de expressões faciais positivas (Fig. 5: manipulação: $F(1,21) = 0,78$; ciclo estral: $F(2,21) = 0,28$; $P > 0.05$), quanto para frequência de protrusões de língua (Fig. 6: manipulação: $F(1,21) = 1,02$; ciclo estral: $F(2,21) = 0,38$; $P > 0.05$).

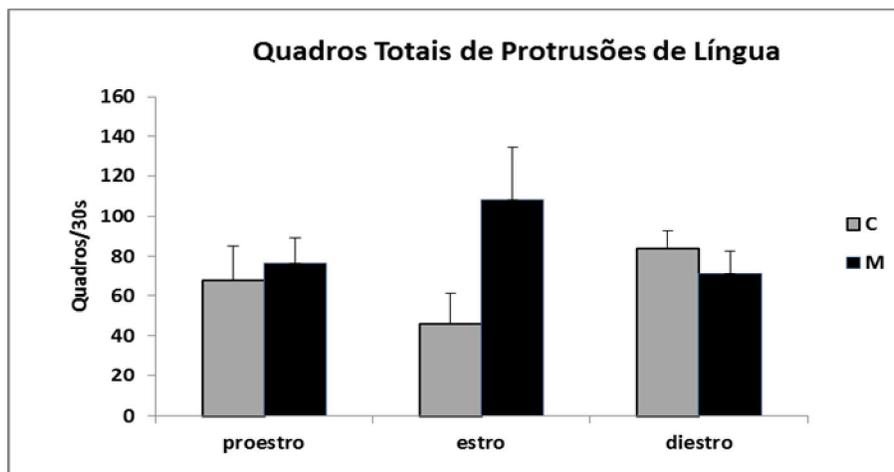


Fig. 3: Respostas afetivas (número total de quadros) à solução de sacarose 0,1 M em ratas de 60 dias. [ANOVA de duas vias utilizando o ciclo estral e a manipulação neonatal como fatores: manipulação, $F(1,21) = 1.80$; ciclo estral: $F(2,21) = 0.06$; $P > 0.05$].

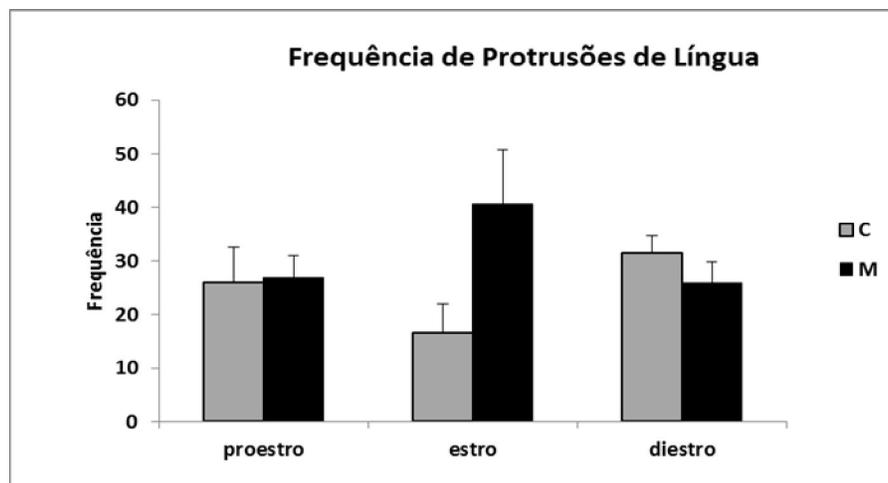


Fig. 4: Respostas afetivas (frequência) à solução de sacarose 0,1 M em ratas de 60 dias. [ANOVA de duas vias utilizando o ciclo estral e a manipulação neonatal como fatores: manipulação, $F(1,21) = 1.35$; ciclo estral: $F(2,21) = 0.08$; $P > 0.05$].

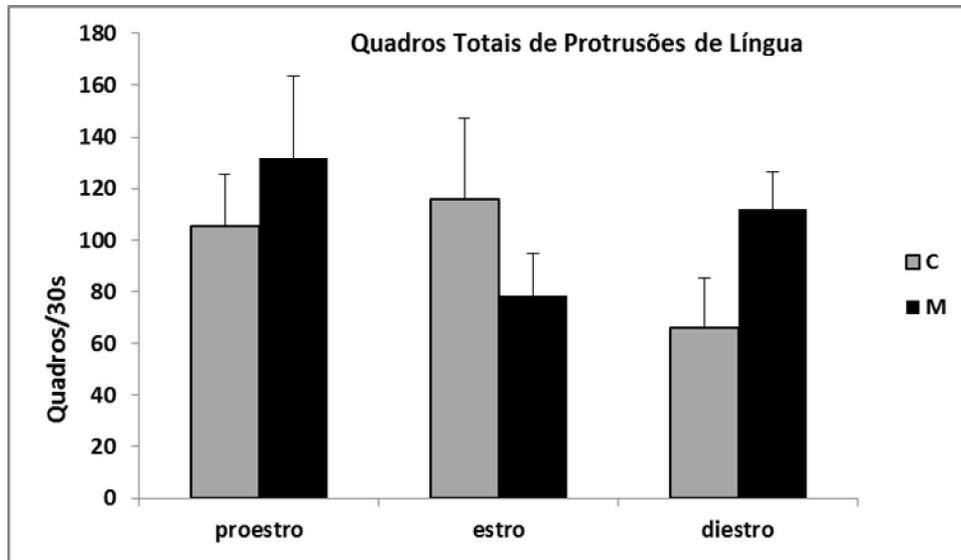


Fig.5: Respostas afetivas (quadros totais) à solução de sacarose 1 M em ratas de 60 dias. [ANOVA de duas vias utilizando o ciclo estral e a manipulação neonatal como fatores: manipulação, $F(1,21) = 0,78$; ciclo estral: $F(2,21) = 0,28$; $P > 0,05$].

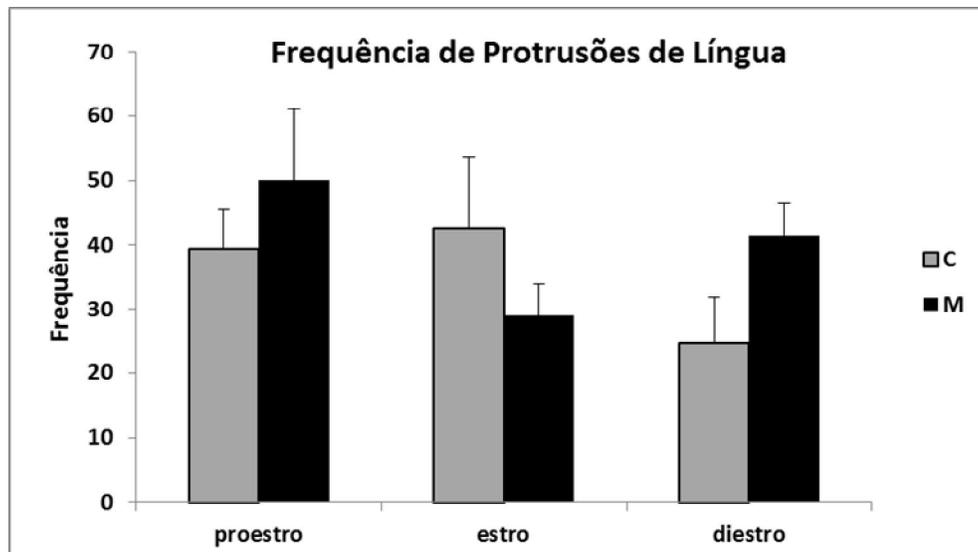


Fig. 6: Respostas afetivas (frequência) à solução de sacarose 1 M em ratas de 60 dias. [ANOVA de duas vias utilizando o ciclo estral e a manipulação neonatal como fatores: manipulação, $F(1,21) = 1,02$; ciclo estral: $F(2,21) = 0,38$; $P > 0,05$].

3.2 Western Blot

A análise de imunotransferência de amostras do núcleo accumbens de animais adultos, não revelou diferença significativa na quantificação do imunocóntéudo de tirosina hidroxilase.

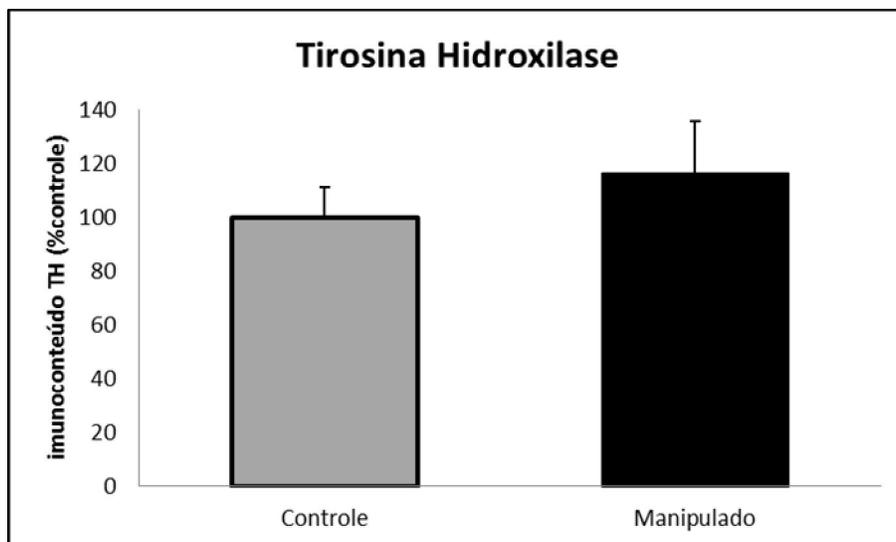


Fig.7: Quantificação do imunocóntéudo de tirosina hidroxilase no núcleo accumbens. Teste t de Student ($P>0,05$).

Discussão

O propósito do presente trabalho foi examinar os efeitos da manipulação neonatal sobre o teste de reatividade ao sabor doce, avaliando ratas fêmeas em duas idades, jovens e adultas. Os resultados indicam menor sensibilidade para o sabor doce nos animais manipulados no período neonatal, quando testados na fase juvenil. No entanto, esse efeito não foi evidenciado durante a idade adulta. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores, que demonstraram que ratos machos manipulados, com 23 e 26 dias de idade, consumiram menos alimento doce quando comparados com o grupo controle, em um teste com rosquinhas doces, o que foi revertido nos animais manipulados adultos, que consumiram mais alimento doce [45]. Assim, esses achados sugerem uma distinta percepção ou resposta de prazer ao sabor doce nessas duas idades, quando comparamos animais manipulados no período neonatal e animais intactos na idade adulta.

É importante ressaltar que o teste com rosquinhas doces é uma tarefa comportamental que avalia o consumo alimentar, e o teste de reatividade ao sabor avalia a percepção de uma solução com caráter de novidade e a reação pré-ingestiva a esta. Outro trabalho de nosso grupo revelou menor resposta hedônica positiva nos ratos machos manipulados, comparados ao grupo controle, em teste na idade adulta [77]. Já em nosso estudo usando ratas fêmeas, não foram observadas diferenças entre manipuladas e controles.

Considerando essa diferença observada na resposta ao sabor doce entre ratos machos e fêmeas manipulados, investigações comportamentais têm revelado diferenças sexuais na preferência por sabores “doce”, “salgado” e “amargo”, o que está altamente correlacionado com as flutuações hormonais das ratas durante o ciclo estral [66]. Essas variações poderiam ajudar a explicar as diferenças observadas entre o presente estudo e o trabalho de Silveira *et al.* [77], que foi realizado com animais machos. No entanto, uma vez que mesmo fazendo-se a análise separando os animais em função da fase do ciclo não se observam diferenças, é possível que outros efeitos, não relacionados aos níveis de hormônios gonadais, sejam importantes nesse caso, como por exemplo ações relacionadas a diferenças sexuais ao longo do desenvolvimento [79].

As fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 [80] (a espécie das linhagens de rato utilizadas em pesquisas pré-clínicas) após a puberdade iniciam o ciclo estral, que consiste de uma flutuação hormonal com duração média de 4 a 5 dias. Este leva à preparação do órgão reprodutor feminino para a ovulação e, posteriormente, para a cópula. O estradiol encontra-se em níveis baixos na primeira fase do ciclo, o diestro 1, aumentando gradualmente durante o diestro 2, podendo persistir até o terceiro dia do diestro. O estradiol induz a expressão de genes necessários a iniciação do comportamento sexual, incluindo a indução de receptores de progesterona [76]. No dia seguinte, proestro, há um aumento repentino dos níveis de estradiol, próximo às 12h, desencadeando a ovulação. Esta onda de estradiol é seguida por uma liberação de progesterona, o que induz o estro comportamental, 4 à 6h depois. A progesterona age sinergicamente ao estradiol induzindo o comportamento sexual, e é responsável, subsequentemente, pelo término da receptividade sexual [76]. Ratas testadas em proestro e diestro apresentaram maior resposta ingestiva em teste de reatividade ao sabor. Enquanto que os animais testados em estro e metaestro (presumidamente com baixos níveis de estradiol), apresentaram respostas semelhantes a machos no mesmo teste [81].

Estudos anatômicos localizaram estradiol em áreas do sistema nervoso central envolvidas com comportamento alimentar e preferência por sabor, incluindo o hipotálamo ventromedial [82] e a amígdala medial [83]. O estradiol afeta variadas regiões do encéfalo, modulando sua fisiologia e funções celulares, assim como a morfologia neuronal. Foi demonstrado diminuição da densidade das espinhas dendríticas no *core* do núcleo accumbens, por influência de administração de estradiol *in vivo*, também evidenciando substituição de espinhas dendríticas maduras por espinhas menos maduras no *core* e *shell* do núcleo accumbens [84]. Essas evidências nos levaram a investigar o comportamento em diferentes fases do ciclo estral. Não foram, no entanto, observadas diferenças nos parâmetros analisados quando comparamos os grupos em distintas fases do ciclo estral.

Estudo de Wilmouth & Spear [85] encontrou que animais pré-puberes são mais responsivos aos estímulos apetitivos do que os adultos, exibindo mais respostas hedônicas positivas para uma solução de sacarose de concentração menor do que a necessária para os adultos demonstrarem diferença, quando comparadas as respostas de

diversas concentrações de sacarose à água. Por outro lado, outros estudos demonstraram que a preferência por sabores “doces” surge após a puberdade, podendo ser eliminada por ovariectomia, e recuperada com administração de estradiol [86]. Em teste com diversas concentrações de sacarose, comparando-se as fases diestro e estro, somente foi encontrada diferença significativa nas respostas hedônicas a sacarose para concentrações baixas [87]. No entanto, no presente trabalho não foi encontrado diferença para as ratas adultas. Essas diferenças entre idades na percepção ou na preferência por sabores doces pode ajudar a explicar a razão pela qual apenas encontramos efeitos da manipulação em ratas juvenis.

Fêmeas manipuladas apresentam atraso na instalação da puberdade [88,89]. Essas observações apoiam a idéia de que as fêmeas manipuladas juvenis apresentam um desenvolvimento distinto do grupo controle (não-manipulado). Em nosso estudo, os animais manipulados foram menos sensíveis que os não-manipulados quando a solução era de menor concentração. Pode haver uma recuperação do sistema envolvido após a puberdade.

Tradicionalmente, o consumo de estímulos apetitivos tem sido utilizado para avaliar o valor hedônico atribuído a esses estímulos, efeitos possivelmente mediados por mudanças na função/sensibilidade da dopamina no sistema mesolímbico [90,91]. Nesse contexto, além do consumo peculiar de alimento doce, animais manipulados na fase neonatal parecem possuir uma neurotransmissão dopaminérgica menos responsiva no núcleo accumbens. Sabe-se que o consumo de alimento doce está associado com aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbens [46], e o baixo metabolismo dopaminérgico pode gerar anedonia, causando maior consumo de alimento palatável ou drogas como tentativa de compensação [90]. Estudos têm sugerido que uma menor excitabilidade do núcleo accumbens poderia aumentar a motivação na busca por drogas [92,93]. Por outro lado, cabe salientar que lesões químicas massivas do sistema dopaminérgico não afetaram a resposta hedônica de gostar [94]. A dopamina parece estar envolvida na avaliação do esforço de obtenção de uma recompensa, e não na reatividade hedônica ao estímulo. E o estradiol parece aumentar a motivação neste comportamento. Portanto, as ratas manipuladas adultas poderiam apresentar um comportamento semelhante ao grupo controle, independentemente de alterações diferenciais do sistema dopaminérgico.

Em função das considerações levantadas acima, avaliamos os níveis da enzima tirosina hidroxilase (enzima essencial no metabolismo dopaminérgico) comparando os grupos manipulado e não-manipulado. No entanto, o presente trabalho não encontrou diferença na quantidade de tirosina hidroxilase entre os grupos. Por outro lado, já foi observado metabolismo dopaminérgico diminuído em animais manipulados [77]. No entanto, o estudo citado não avaliou especificamente a atividade de tirosina hidroxilase, e foi realizado utilizando ratos machos. Diversos trabalhos demonstram alteração do sistema dopaminérgico por influência do estradiol, como aumento na liberação de dopamina [95] e aumento do *binding* aos receptores D1 e D2 [96,97] após administração de altos níveis de estradiol. No caso dos animais manipulados, não foram observadas diferenças

significativas nos níveis de estradiol em animais manipulados, quando comparados aos não-manipulados [98]. Não se pode descartar, porém, que haja um metabolismo dopaminérgico diminuído como resultado da manipulação, o que pode ter sido revertido por influência hormonal após a puberdade.

O modelo de teste de reatividade ao sabor avalia a atividade do sistema de recompensa e motivação do animal. Um outro modelo muito válido é o de busca e consumo de drogas. A literatura apresenta trabalhos com metanfentamina e cocaína, duas drogas que aumentam a liberação de dopamina. É sabido que animais manipulados não apresentam sensibilidade a atividade locomotora induzida por cocaína, porém apresentam aumento nos níveis de dopamina no núcleo accumbens em resposta a um estressor moderado [53]. Adicionalmente, densidade reduzida de receptores dopaminérgicos D3 é descrita nesta região em animais manipulados [53], o que indicaria uma menor resposta e comportamento de busca dos animais manipulados à recompensa. O metilfenidato, um psicoestimulante que aumenta os níveis extracelulares de dopamina e norepinefrina (similar ao efeito da cocaína e da anfetamina), pode induzir preferência por lugar em tarefa comportamental [99]. Animais manipulados não apresentam resposta a essa droga [77], o que contribui com a idéia de que estes são menos sensíveis aos efeitos de recompensa de alguns reforços, como visto nos animais jovens.

Os resultados deste trabalho indicam que os animais manipulados, quando testados na idade jovem, apresentam menor reatividade ao sabor doce, evidenciada para baixas concentrações de sacarose em solução. Uma futura avaliação do metabolismo dopaminérgico nesta idade pode ser de grande ajuda na elucidação desta questão. A ausência de diferença nas fêmeas adultas pode ser resultado da forte influência do estradiol sobre o sistema dopaminérgico, envolvido na reatividade, motivação e busca por recompensa, uma vez que ocorreu, nas adultas, uma reversão dos efeitos da manipulação evidenciados nos animais jovens. Uma avaliação mais detalhada do metabolismo dopaminérgico e de outros neurotransmissores relacionados à percepção de recompensa é necessária para conclusões mais acertadas sobre a influência hormonal nos animais manipulados quando adultos.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao suporte técnico dos funcionários do ratário do Departamento de Bioquímica. O trabalho recebeu apoio financeiro de CNPq e FAPERGS/PRONEX.

Referências Bibliográficas

- [1] Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping styles. *Experientia* 1991; 47: 1008–19.
- [2] Castanon H, Mormede P. Psychobiogenetics: adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. *Psychoneuroendocr* 1994; 19: 257–82.
- [3] Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Devl Neurosci* 1998; 16: 149-64.
- [4] Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, Sarrieau A. The effect of neonatal handling on the development of adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocr* 1991; 16: 85–103.
- [5] Gonzáles AS, Rodriguez Echandia EL, Cabrera R, Foscolo MR, Fracchia LN. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiol Behav* 1990; 47(4): 735-41.
- [6] Herzog DB, Staley JE, Carmody S, Robbins WM, van der Kolk BA. Childhood sexual abuse in anorexia nervosa and bulimia nervosa: a pilot study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatr* 1993; 32: 962–66.
- [7] Rorty M, Yager J. Histories of childhood trauma and complex posttraumatic sequelae in women with eating disorders. *Psychiatr Clin North Am* 1993; 19: 773–91.
- [8] Gupta MA, Schork NJ. Touch deprivation has an adverse effect on body image: some preliminary observations. *Int J Eating Disord* 1995; 17: 185–9.
- [9] Meaney M.J, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 1988; 239: 766–8.
- [10] Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Takahashi K. Periodic maternal deprivation-induced potentiation of the negative feedback sensitivity to glucocorticoids to inhibit stress-induced adrenocortical response persists throughout the animal's life-span. *Neurosci Lett* 1994; 168: 89–92.
- [11] Lee MH, Williams DI. Changes in licking behavior of rat mother following handling of young. *Animal Behav* 1974; 22: 679-81.
- [12] Lee MH, Williams DI. Reaction of rat mothers to experimental disturbance. *Bull Psychonomic Soc* 1975; 7: 489-90.
- [13] Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997; 12(5332): 1659-62.

- [14] Bell RW, Nitschke W, Gorry TH, Zachma T. Infantile stimulation and ultrasonic signaling: a possible mediator of early handling phenomena. *Dev Psychobiol* 1971; 4: 181.
- [15] Branchi I, Alleva E. Communal nesting, an early social enrichment, increases the adult anxiety-like response and shapes the role of social context in modulating the emotional behavior. *Behav Brain Res* 2006; 172 (2): 299–306.
- [16] Macri S, Mason GJ, Wurbel H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur J Neurosci* 2004; 20(4): 1017-24.
- [17] Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney, MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(9): 5335-40.
- [18] Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 1957; 126 (3270): 405.
- [19] Weaver IC, Meaney MJ, Szyf M. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(9): 3480-5.
- [20] Cirulli F, Berry A, Alleva E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 2003; 27(1-2): 73–82.
- [21] Cushing BS, Kramer KM. Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: the role of neuropeptides and steroids. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29(7): 1089–105.
- [22] Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocr* 2005; 30(10): 939-46.
- [23] Meaney MJ, Szyf M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? *Trends Neurosci* 2005; 28(9):456-63.
- [24] Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann NY Acad Sci* 1994; 30 (746): 275-88.
- [25] Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev* 1986; 396(1): 64-76.
- [26] Haltmeyer GC, Denenberg VH, Thatcher J, Zarrow MX. Response of the adrenal cortex of the neonatal rat after subjection to stress. *Nature* 1966; 17(212): 1371-3.
- [27] Bartova, A. Functioning of the hypothalamo-pituitary-adrenal system during postnatal development in rats. *Gen and Comp Endocrinol* 1968; 10(2): 235-9.

- [28] Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto, R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 2003; 68(5): 439-45.
- [29] Levine S., Haltmeyer G. C.; Karas, G. C.; Denenberg, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav* 1967 2: 55-9.
- [30] Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocr* 1999; 11(12): 925-33.
- [31] Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18(3): 195-200.
- [32] Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocr* 1989; 50(5): 597-604.
- [33] De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998; 19(3): 269-301.
- [34] Meaney MJ, Aitken DH, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging* 1991; 12: 31.
- [35] Francis DD, Diorio J, La Plante P, Weaver S, Seckl JR, Meaney MJ. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress and glucocorticoid receptors. *Ann NY Acad Sci* 1996; 20(794): 136-52.
- [36] Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ. Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H]flunitrazepam binding in rat brain. *E J Pharmacol* 1987; 144: 105-7.
- [37] Bolden SW, Hambley JW, Johnston GAR, Rogers LJ. Neonatal stress and long-term modulation of GABA receptors in the rat brain. *Neurosci Lett* 1990; 111: 258-62.
- [38] Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 2001; 115(6): 1332-40.
- [39] Smythe JW, Rowe WB, Meaney MJ. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Dev Brain Res* 1994; 80: 183-9.
- [40] Shanks N, Griffiths J, Zalzman S, Zacharko RM. Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 36: 515-9.
- [41] Zaharia MD, Kulczycki J, Shanks N, Meaney MJ, Anisman J. The effects of early postnatal stimulation on Morris water-maze acquisition in adult mice: genetic and maternal factors. *Psychopharmacol* 1996; 128: 227-39.

- [42] Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adults rats. *Physiol Behav* 2004; 80: 739-45.
- [43] Silveira PP, Portella AK, Crema L, Correa M, Nieto FB, Diehl L *et al.* Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. *Physiol Behav* 2008; 93: 877-82.
- [44] Benetti CS, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS *et al.* Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res* 2007; 62: 405- 11.
- [45] Silveira PP, Cognato G, Crema LM, Pederiva FQ, Bonan CD, Sarkis JJ *et al.* Neonatal Handling, Sweet Food Ingestion and Ectonucleotidase Activities in Nucleus Accumbens at Different Ages. *Neurochem Res* 2006; 31(5): 693-8.
- [46] Hajnal A, Smith GP, Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R31-R37.
- [47] Wyvell CL, Berridge KC. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or response reinforcement. *J Neurosci* 2000; 20: 8122-30.
- [48] Schultz W. Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol*; 2006
- [49] Ahn S, Phillips AG. Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *J Neurosci* 1999; 19: B1-B6.
- [50] Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1481-1489.
- [51] Koob GF e Moal ML. *Neurobiology of addiction*. Academic Press: New York; 2006.
- [52] Papaioannou A, Dafni U, Alikaridis F, Bolaris S, Stylianopoulou F. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neurosci* 2002; 114(1): 195-206.
- [53] Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 2004; 19(7): 1863-74.
- [54] Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav* 2009; 97(5): 537-50.
- [55] Reilly S, Schachtman TR, editors. *Conditioned taste aversion: behavioral and neural processes*. New York: Oxford University; 2009.
- [56] Steiner JE, Glaser D, Hawilo ME e Berridge KC. Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 53-74.

- [57] Berridge KC. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 173–98.
- [58] Beatty WW. Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology: Sexual Differentiation*, edited by A. A. Gerall, H. Moltz, and I. L. Ward. New York: Plenum. 1992; 11: 85–128.
- [59] Flynn FW, Schulkin J, and Havens M. Sex differences in salt preference and taste reactivity in rats. *Brain Res Bull* 1993; 32: 91–5.
- [60] Laviano AM, Meguid J, Gleason Z-J, Yang, and T. Renvyle. Comparison of long-term feeding pattern between male and female Fischer 344 rats: influence of estrous cycle. *Am J Physiol* 1996; 270(2 pt 2): R413–9.
- [61] Beatty WW, O'Briant DA, and Vilberg TR. Effects of ovariectomy and estradiol injections in food intake and body weight in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 1975; 3: 539–44.
- [62] Stevens R. Estradiol benzoate potentiates the effects of bodyrestraint in suppressing food intake and reducing body weight. *Physiol Behav* 1989; 45: 1–5.
- [63] Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, Dalmaz C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76(2): 327-33.
- [64] Fantino M, and Brinnel H. Body weight set-point changes during the ovarian cycle: experimental study of rats using hoarding behavior. *Physiol Behav* 1986; 36: 991–6.
- [65] Ter Haar MB. Circadian and estrual rhythms in food intake in the rat. *Horm Behav* 1972; 3: 213–9.
- [66] Gandelman R. Gonadal hormones and sensory function. *Neurosci Biobehav* 1983; 7: 1–17.
- [67] Blaustein JD, Wade GN. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav* 1976; 17: 201–8.
- [68] Drewett RF. The meal patterns of the oestrous cycle and their motivational significance. *Q J Exp Psychol* 1974; 26: 489– 94.
- [69] Eckel LA. Ingestive behaviour in female rats: influence of the ovarian cycle. *Appetite* 1999; 32: 274.
- [70] Eckel LA. Estradiol: an indirect control of meal size. *Physiol Behav* 2004; 82: 35 – 41.
- [71] Eckel LA, Houpt TA, Geary N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol Behav* 2000; 70: 397– 405.
- [72] Kornstein SG. Chronic depression in women. *J Clin Psychiatry* 2002; 63: 602– 9.
- [73] Oliver G, Wardle J. Perceived effects of stress on food choice. *Physiol Behav* 1998; 66: 511 – 5.

- [74] Kelly RH, Danielson BH, Zatzick DF, Haan MN, Anders TF, Gilbert WM *et al.* Chart-recorded psychiatric diagnoses in women giving birth in California in 1992. *Am J Psychiatry* 1999; 156(6): 955-7.
- [75] Harris RBS, Zhou J, Mitchell T, Hebert S, Ryan DH. Rats fed only during the light period are restraint to stress-induced weight loss. *Physiol Behav* 2002; 76: 543– 50.
- [76] McCarthy MM, Becker JB. Neuroendocrinology of sexual behavior in the female. *Behavioral Endocrinology*. 2nd ed. Cambridge, MA 2002; 117–152.
- [77] Silveira PP, Portella AK, Assis SACN, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Devl Neurosci* 2010; 28: 111–8.
- [78] Bowyer JF, Frame LT, Clausing P, Nagamoto-Combs K, Osterhout CA, Sterling CR *et al.* Long-term Effects of Amphetamine Neurotoxicity on Tyrosine Hydroxylase mRNA and Protein in Aged Rats. 1998; 21(2): 1074-85.
- [79] Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, McCarthy MM. Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. *Trends Endocr Metab* 2010; 21: 553-61.
- [80] Berkenhout J. *Outlines of the Natural History of Great Britain and Ireland*. 1st ed. London: 1769.
- [81] Clarke SNDA, Ossenkopp KP. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 274: 718-24.
- [82] Gesell C, Fisher GL. Caffeine aversion and saccharin preference in rats without olfactory bulbs. *Physiol Behav* 1968; 3: 523–5.
- [83] Kemble ED, Schwartzbaum JS. Reactivity to taste properties of solutions following amygdaloid lesions. *Physiol Behav* 1969; 4: 981–5.
- [84] Staffend NA, Loftus CM e Meisel RL. Estradiol reduces dendritic spine density in the ventral striatum of female Syrian hamsters. *Brain Struct Funct* 2011; 215: 187–94.
- [85] Wilmouth CE, Spear LP. Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: Taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 92: 566–73.
- [86] Wade GN, Zucker I. Taste preferences of female rats: modification by neonatal hormones, food deprivation and prior experience. *Physiol Behav* 1969; 4: 935–43.
- [87] Achtlej DPD, Weaver KL, Eckel LA. Taste responses to dilute sucrose solutions are modulated by stage of the estrous cycle and fenfluramine treatment in female rats. *Physiol Behav* 2005; 86: 265-71.
- [88] Gomes CM, Pereira FM, De Paula PR, Sanvitto GL, Lucion AB. Efeito da manipulação neonatal sobre a idade da instalação da puberdade em ratas. *Abstr XVI Reun Anu Fed Sociedades Biol Exp* 2001; 16: 52.

- [89] Sieck MS, Ramaley JA. Effects of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. *Physiol Behav* 1975; 15: 487–9.
- [90] Wise RA, Spindler J, deWit H, Gerberg GJ. Neuroleptic-induced “anhedonia” in rats: pimozide blocks reward quality of food. *Science (New York, NY)* 1978; 201(4352): 262–4.
- [91] Wise RA, Bozarth MA. Action of drugs of abuse on brain reward systems: an update with specific attention to opiates. *Pharmacol Biochem Behav* 1982; 17(2): 239–43.
- [92] Kourrich S, Rothwell PE, Klug JR, Thomas MJ. Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 2007; 27: 7921–8.
- [93] Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacol* 2003; 168: 3–20.
- [94] Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev* 1998; 28: 309–69.
- [95] Becker JB. Estrogen rapidly potentiates amphetamine-induced striatal dopamine release and rotational behavior during microdialysis. *Neurosci Lett* 1990; 118 (2), 169–71.
- [96] Di Paolo T, Poyet P, Labrie F. Effect of chronic estradiol and haloperidol treatment on striatal dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 1981; 73 (1), 105–6.
- [97] Levesque D, Di Paolo T. Chronic estradiol treatment increases ovariectomized rat striatal D-1 dopamine receptors. *Life Sci* 1989; 45 (19), 1813–20.
- [98] Severino GS, Fossati IAM, Padoin MJ, Gómes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav* 2004; 81: 489-98.
- [99] Meririnne E, Kankaanpaa A, Seppala T. Rewarding properties of methylphenidate: sensitization by prior exposure to the drug and effects of dopamine D1- and D2-receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 298, 539–50.