

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

INVESTIGAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR NA VIDA ADULTA DE RATOS
SUBMETIDOS A REGIME DE
SUPERALIMENTAÇÃO NO PERÍODO DE
LACTAÇÃO.

TESE DE DOUTORADO
ANDRÉ KRUMEL PORTELLA

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

INVESTIGAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO
ALIMENTAR NA VIDA ADULTA DE RATOS
SUBMETIDOS A REGIME DE
SUPERALIMENTAÇÃO NO PERÍODO DE
LACTAÇÃO.

ANDRÉ KRUMEL PORTELLA

Orientador: Marcelo Zubaran Goldani

A apresentação desta tese 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 Doutor.

Ficha Catalográfica

P843i Portella, André Krumel

Investigação sobre o comportamento alimentar na vida adulta de ratos submetidos a regime de superalimentação no período de lactação / André Krumel Portella ; orient. Marcelo Zubarán Goldani. – 2010.

108 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Comportamento alimentar 2. Ratos 3. Hiperfagia 4. Lactação 5. Modelos animais I. Goldani, Marcelo Zubarán II. Título.

NLM: WI 143

**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:

20/12/2010

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profa. Dra. Ingrid Dalira Schweigert Perry
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Roberto Mário Silveira Isler
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Josiane Ranzan
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dedicatória

Para Patrícia, minha companheira em absolutamente tudo, minha esposa querida e amada. E para minha filhinha Beatriz.

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado nesse rico caminho,

ao meu orientador, pela confiança, apoio e motivação,

aos colegas do lab37 e todos os colaboradores do NESCA

A minha família, pelo apoio e compreensão

À Universidade (UFRGS), ao Programa de Pós-Graduação

(PPGSCA) e a

Unidade de Experimentação Animal (UEA).

Ao CNPq, FINE e CAPES por viabilizarem este trabalho e

especialmente pela concessão de

minha bolsa de Doutorado no país.

Epígrafe

Psicologia de um Vencido

Eu, filho do carbono e do amoníaco,
Monstro de escuridão e rutilância,
Sofro, desde a epigênese da infância,
A influência má dos signos do zodíaco.

Profundissimamente hipocondríaco,
Este ambiente me causa repugnância...
Sobe-me à boca uma ânsia análoga à ânsia
Que se escapa da boca de um cardíaco.

Já o verme - este operário das ruínas -
Que o sangue podre das carnificinas
Come, e a vida em geral declara guerra,

Anda a espreitar meus olhos para roê-los,
E há de deixar-me apenas os cabelos,
Na frialdade inorgânica da terra!

Augusto dos Anjos

RESUMO

Alimentação hedônica e homeostática são fatores independentes envolvidos no desenvolvimento da obesidade. Apesar de já se saber que a superalimentação precoce altera a alimentação não hedônica na vida adulta, pouco se sabe sobre seu impacto sobre a preferência por alimentos doces. O objetivo deste trabalho foi o de verificar o comportamento alimentar de ratos superalimentados no período de lactação, com foco principalmente no comportamento alimentar hedônico, e correlacionar com o funcionamento do sistema dopaminérgico mesolímbico, que sabidamente está envolvido na sua regulação. Ninhadas de ratos foram reduzidas a 4 filhotes (ninhada pequena - SL) ou 8 filhotes (ninhada normal - NL) no dia 1 de vida. O desmame ocorreu no dia 21, e todos os testes foram realizados a partir do dia 84 de vida. O consumo de ração foi realizado em condições basais, em resposta à jejum de 24h, na presença de comida palatável (doce), durante isolamento social, e em resposta ao teste de pinçamento da cauda (*tail-pinch*). Antes de testados com alimento doce, os ratos foram habituados a esse alimento. Locomoção foi aferida em um aparato automatizado. A Área Tegmentar Ventral (VTA) e o Núcleo Accumbens (Acc) foram dissecados a partir de microfatias congeladas. Tecido muscular foi dissecado e processado para medida da fosforilação de AKT (p-AKT) em resposta à insulina. AKT, p-AKT e Tirosina Hidroxilase (TH) foram medidas por método de *western-blot*. A quantidade de gordura abdominal foi cuidadosamente dissecada e pesada. Resultados: Ratos SL foram mais pesados que os NL em todas as medidas, e ao sacrifício apresentavam maior gordura abdominal ($p=0,035$). A atividade locomotora não foi diferente quanto à distância percorrida, mas os ratos SL exploraram a região central por mais tempo, indicando menor

comportamento ansioso ($p=0,036$). Não se encontrou diferenças quanto ao consumo de ração padrão ($p=0,085$) ou alimento doce em condições basais ($p=0,65$), mas ratos SL tiveram maior consumo de doce num paradigma de escolha com ração-padrão ($p=0,017$) e em resposta ao estresse de pinçamento da cauda (interação teste x grupo, $p=0,006$). TH encontrou-se aumentada em ratos SL, tanto no VTA ($p=0,016$) quanto no Acc ($p=0,022$). Ratos SL não diferiram quanto a fosforilação do AKT no músculo, porém tiveram menor AKT ($p=0,047$), o que sugere uma resistência periférica à insulina latente. Em conclusão, a exposição a superalimentação no período de lactação reduz a ansiedade, induz obesidade e programa o comportamento alimentar persistentemente, de maneira que esses animais têm maior preferência por alimento doce. A esses resultados se soma a alteração dos níveis de TH nas vias mesolímbicas, o que sugere a participação destas nessa alteração de comportamento.

Palavras-chave: superalimentação precoce, origens desenvolvimentistas da saúde do adulto (DOHaD), Dopamina, comportamento alimentar.

ABSTRACT

Hedonic and homeostatic food intakes are independent factors involved in the development of obesity. Although it is well known that early life overfeeding increases food intake in adulthood, little is known about its impact on the palatable food preference in adulthood. We aimed at verifying feeding behavior in this model, with special focus in the hedonic compound, and correlate it to the dopaminergic mesolimbic pathway known to be involved in its regulation. Rat litters were standardized to 4 (small litter - SL) or 8 pups (normal litter- NL) at postnatal day 1. Weaning was at day 21, and all tests were conducted after day 84 of life. Chow consumption was measured at baseline, in response to 24h fasting, in the presence of palatable food, during social isolation and after 1 min. tail pinch stress. Prior to testing sweet food, rats were habituated to the sweet pellets. Locomotion was assessed in an automated box. The ventral tegmental area (VTA) and nucleus accumbens were micro dissected from frozen brain slices. Muscular tissue was also dissected for assessing the phosphorylation of Akt in response to an insulin challenge. Akt, pAkt and TH proteins were assessed by Western-blot. The abdominal fat content was weighed. Results: SL rats were heavier than NL at all time points and had increased abdominal fat at sacrifice ($p=0.035$). Locomotor activity was not different with regard to total distance, but SL rats spent more time in the center of the box, an indicative of less anxiety ($p=0.036$). No difference was found in chow ($p=0.085$) or sweet food intake at baseline ($p=0.65$), but SL rats had higher intake of sweet pellets in a two food choice paradigm ($p=0.017$) and in response to tail pinch stress (test x group interaction, $p=0.006$). TH was higher in SL rats VTA ($p=0.016$) and in the nucleus accumbens ($p=0.022$). SL animals had decreased Akt in the muscle

($p=0.047$), which suggest a latent peripheral insulin resistance, but p-AKT and the AKT/p-AKT ratio were not different. In conclusion, exposure to overfeeding during the neonatal period decreases anxiety, induces obesity and programs the feeding behavior persistently, in such a way that the animals eat more palatable food. These results are associated with a higher TH protein content and transport in these animals, which suggests that the dopaminergic mesolimbic circuitry may involved in the behavioral findings.

Keywords: early overfeeding, developmental origins of health and disease (DOHaD), dopamine, feeding behavior.

Lista de Ilustrações

Figura 1

Linha do tempo apresentando o delineamento de pesquisa22

Figura 2

Ganho de peso do desmame ao dia 84 de vida de animais gerados em ninhadas de tamanho normal (NL) comparado com animais de ninhadas de tamanho reduzido (SL).34

Figura 3

Índice de adiposidade abdominal de animais gerados em ninhadas de tamanho normal (NL) comparado com animais de ninhadas de tamanho reduzido (SL).35

Figura 4

Porcentagem do tempo dispendido na exploração da porção central do aparato de campo aberto.36

Figura 5

a- Níveis de AKT total no músculo após injeção de insulina ou solução salina.
b- Níveis de AKT fosforilado no músculo após injeção de insulina ou solução salina.
c- Relação AKT fosforilado /AKT total no músculo após injeção de insulina ou solução salina.37

Figura 6

a- Resposta de consumo de ração padrão ao isolamento social
b- Resposta de consumo de ração padrão a um jejum de 24h
.....40

Figura 7

Teste de preferência alimentar entre ração padrão e alimento doce na caixa-moradia (Froot Loops®, Kellogs). Consumo em calorias / 24h. 42

Figura 8

Consumo de alimento doce em 1h, após realização de estresse de *tail-pinch* (pinçamento da cauda) de 1min.43

Figura 9

Conteúdo de TH nos núcleos VTA e Acc do sistema mesolímbico
.....44

Lista de Abreviaturas ou Siglas

- OMS = Organização Mundial da Saúde.
IMC = Índice de Massa Corporal.
HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica.
ENDEF = Estudo Nacional sobre Padrões de Vida.
PPV = Pesquisa sobre Padões de Vida.
POMC = Proopiomelanocortina.
CCK = Colecistocinina.
ATP = Adenosina Tri-Fosfato.
ARC = núcleo arqueado do hipotálamo.
GABA = ácido gama-aminobutírico.
CART = peptídeo relacionado à cocaína e à anfetamina.
NPY = neuropeptídeo Y.
AGRP = Proteína Relacionada ao Gene Cutia.
MCH = hormônio concentrador de melanina .
VMH = Hipotálamo Ventro-Medial.
PVN = Núcleo Para-Ventricular do Hipotálamo.
CRH = Hormônio Liberador de Corticotrofina.
TRH = Hormônio Liberador de Tireotrofina.
NTS = núcleo do trato solitário.
VTA = área tegmental ventral.
PET = Tomografia por Emissão de Pósitrons.
CB1 = receptor canabinoide tipo 1.
DOHaD = Origens desenvolvimentistas da Saúde e da Doença.
TH = Tirosina Hidroxilase.
SL = Ninhada Reduzida.
NL = Ninhada Normal, ou Controle.
ICLAS = International Council for Laboratory Animal Science.
EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético.
Acc = NúcleoAccumbens.
AKT = Proteína Quinase B ou PKB.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 03 |
| 2.1 Definições de Sobrepeso e Obesidade | 03 |
| 2.2 Obesidade e doença | 04 |
| 2.3 Epidemia de Obesidade | 06 |
| 2.4 Programação Metabólica | 07 |
| 2.5 Origem Precoce da Obesidade | 08 |
| 2.6 Superalimentação Neonatal | 09 |
| 2.7 Balanço Energético e comportamento alimentar | 12 |
| 2.7.1 Regulação do Comportamento Alimentar | 13 |
| 2.7.2 Sistemas neurais envolvidos na regulação do comportamento alimentar | 14 |
| 2.7.3 O sistema mesolímbico e a regulação do apetite | 18 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 20 |
| 4 OBJETIVOS | 21 |
| 5 METODOLOGIA | 22 |
| 5.1.1 Desenho Experimental | 22 |
| 5.1.2 Linha do tempo | 22 |
| 5.2 Geração das ninhadas e protocolo de superalimentação neonatal | 23 |
| 5.3 Acompanhamento do crescimento após o desmame, e quantificação da adiposidade abdominal | 24 |
| 5.4 Avaliação do Consumo Alimentar | 25 |
| 5.4.1 Consumo de ração padrão em condições basais | 25 |
| 5.4.2 Avaliação do consumo alimentar após isolamento social | 26 |
| 5.4.3 Avaliação da hiperfagia de rebote após jejum | 26 |
| 5.4.4 Avaliação do consumo de alimento doce | 27 |

| | | |
|---------|--|----|
| 5.4.4.1 | Habituação e consumo basal | 27 |
| 5.4.4.2 | Teste de preferência de alimento doce versus ração padrão | 27 |
| 5.4.5 | Teste de resposta ao tail-pinch | 28 |
| 5.5 | Locomoção em campo aberto | 29 |
| 5.6 | Avaliação resistência tecidual periférica à insulina | 29 |
| 5.7 | Obtenção das amostras de tecido encefálico | 30 |
| 5.8 | Western Blot | 30 |
| 5.9 | Análise estatística | 31 |
| 6 | RESULTADOS | 33 |
| 6.1 | Peso e composição corporal..... | 33 |
| 6.2 | Teste de locomoção..... | 35 |
| 6.3 | Avaliação da resistência periférica a insulina..... | 36 |
| 6.4 | Testes de consumo alimentar..... | 39 |
| 6.4.1 | Consumo basal..... | 39 |
| 6.4.2 | Resposta ao isolamento e ao jejum..... | 39 |
| 6.4.3 | Alimento doce: basal, preferência e teste de tail-pinch | 41 |
| 6.5 | Conteúdo de Tirosina Hidroxilase (TH) em núcleos do sistema mesolímbico. | 43 |
| 7 | DISCUSSÃO | 45 |
| 8 | CONCLUSÕES | 49 |
| 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| 10 | ANEXOS | |
| 10.1 | ANEXO 1: Artigo submetido. | 61 |
| 10.1.1 | Comprovação de submissão..... | 61 |
| 10.1.2 | Corpo do artigo..... | 62 |

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos vários estudos têm demonstrado que eventos perinatais podem impactar a saúde do indivíduo a longo prazo. Os relatos iniciais de Barker e seus colegas relacionaram o baixo peso ao nascer com o maior risco cardiovascular na vida adulta baseavam-se principalmente na teoria de que o feto adaptar-se-ia à desnutrição intra-uterina através de uma série de alterações metabólicas e hormonais (Barker, 1998), que o levariam a estabelecer uma forma econômica de manejo da energia - do inglês "*Thrifty Phenotype*" ou "Fenótipo Poupador" - (Hales e Barker, 1992).

Logo, descobriu-se que eventos relacionados ao excesso de crescimento intra-uterino também deixavam marcas permanentes sobre o indivíduo. Tal fato é evidenciado pela constatação por McCance et al em 1994, de que a incidência de diabetes-melitus tipo 2 em relação ao peso ao nascer, na população de índios norte americanos *pime indians*, ocorria em formato de "curva em U". Nesse estudo observou-se que tanto maior quanto menor peso ao nascer conferem um risco aumentado para esta doença na vida adulta (McCance, Pettitt *et al.*, 1994; Dabelea, Hanson *et al.*, 2000; Pettitt e Jovanovic, 2001).

Hoje enfrentamos um assustador aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade de abrangência mundial. A obesidade é uma doença multifatorial, cujas causas variam num espectro que vai desde as causas puramente genéticas, até as totalmente ambientais. Dentre o pouco que já se conhece sobre a atual epidemia, sabe-se que ela é resultado de uma mudança ambiental, traduzida pela transição

demográfica decorrente da melhoria das condições de vida e de acesso a recursos (Wang, Monteiro *et al.*, 2002).

Nesse contexto, não é de se espantar que desde a vida intra-uterina estejamos expondo nossas crianças a um ambiente de excesso, propício ao acúmulo energético. Kim et al, em um estudo que avaliou a tendência de sobrepeso em pré-escolares de classe média de Massachusetts nos EUA, de 1980 a 2001, mostraram que a incidência aumentou inclusive na faixa etária de menores de 6 meses de idade (Kim, Peterson *et al.*, 2006). Esse é um fato de extrema relevância biológica, visto o caráter potencializador dos efeitos de programação metabólica e pelo conseqüente maior tempo de exposição ao excesso de peso.

Um dos mecanismos propostos para esse aumento precoce do peso passa inevitavelmente pela exposição a um excesso de alimentação nessa fase da vida, visto que o gasto energético é um fator menos importante nessa idade. Essa superalimentação neonatal tem sido bem estudada em modelos animais, e tem mostrado que o excesso de nutrientes, especialmente os ricos em energia, provocam uma resposta hormonal-metabólica que inclui o aumento da insulina e leptina. Estes hormônios possuem importante papel na alteração da ontogênese das vias hipotalâmicas relacionadas ao controle do balanço energético, afetando tanto o gasto calórico quanto o apetite no longo prazo e propiciando o aparecimento do sobrepeso/obesidade (Plagemann, 2008).

No entanto, dentro da investigação do consumo alimentar, pouco se tem estudado sobre o papel do apetite hedônico, ou seja, aquele que está mais relacionado ao prazer em se alimentar, e que tem um importante potencial de indução e manutenção da obesidade (Saper, Chou *et al.*, 2002; Mela, 2006; Vartanian, Schwartz *et al.*, 2007). Estudos em humanos já mostraram que o baixo peso ao nascer está

associado ao aumento de preferência por certos macronutrientes, como carboidratos (Barbieri, Portella *et al.*, 2009) e gordura (Lussana, Painter *et al.*, 2008). O objetivo desse trabalho é investigar, a partir de um modelo clássico de superalimentação neonatal, a possível indução de um fenótipo de obesidade relacionado com uma alteração do componente hedônico do apetite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Definições de Sobrepeso e Obesidade

Um complicador importante no estudo da obesidade, especialmente quando envolve crianças, é a variedade da terminologia empregada (Guillaume, 1999; Neovius, Linne *et al.*, 2004; Flegal, Tabak *et al.*, 2006). De uma maneira geral, o sobrepeso pode ser definido como o excesso de peso para determinada idade e a obesidade como o excesso de gordura acumulada (Himes e Dietz, 1994). No entanto, a dificuldade de se medir a gordura corporal acaba por exigir o uso de um substituto mais fácil de ser medido. Esse substituto geralmente é o Índice de Massa Corporal, ou IMC, que é calculado a partir do peso corporal (em Kg) dividido pelo quadrado da altura (m) ($IMC = \text{Peso} / \text{Altura}^2$), e que possui correlação importante com a quantidade de gordura corporal ($r \approx 0,9$) e desfechos de saúde, tanto em homens quanto em mulheres (Spiegelman, Israel *et al.*, 1992; Sun, Van Dam *et al.*, 2010).

Para adultos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o sobrepeso é definido como $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e a obesidade como $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Who, 2000). Já a classificação para a população pediátrica é baseada numa curva de IMC para idade, e usa valores de percentis como referência para a determinação das categorias, uma vez que o IMC das crianças varia conforme a idade e sexo (Dietz e Bellizzi, 1999). Classifica-se as crianças, então, na categoria de sobrepeso quando estiverem entre os percentis iguais ou maiores que 85 e menores que 95, e como obesas se estiverem no percentil maior ou igual a 95. Ainda sobre a terminologia para a classificação em crianças, há de se ressaltar que ela mudou recentemente (apenas os nomes das categorias, não os percentis de corte) (Ogden e Flegal, 2010) para melhor refletir, segundo dois comitês de *experts* norte-americanos, a séria e urgente realidade de epidemia atual (Koplan, Liverman *et al.*, 2005; Krebs, Himes *et al.*, 2007). Assim, ao revisar literatura mais antiga, recomenda-se atenção.

Esse projeto usa de um modelo animal para a investigação proposta. Sendo assim, quando se refere ao termo obesidade, entenda-se que se refere ao processo de acumulação de gordura corporal, e não à classificação categorica obeso/não obeso. Até porque não existem padrões definidos para obesidade em ratos, e qualquer categorização seria apenas arbitrária.

2.2 Obesidade e doença

A evidência acumulada até os dias de hoje nos mostra a inegável contribuição negativa do acúmulo de gordura para o estado de saúde da população (Schelbert,

2009), mais ainda quando se leva em conta o custo social e econômico implicados (Withrow e Alter, 2010).

A obesidade está associada a várias condições de saúde (Willett, Dietz *et al.*, 1999), tanto agudas quanto crônicas. A curto prazo encontram-se tanto alterações psicológicas associadas à redução da auto-estima, decorrente tanto dos problemas relacionados ao preconceito social e à discriminação, como das características do seu comportamento alimentar (Stunkard e Wadden, 1992; Strauss, 2000). Já a mais longo prazo, começa-se a observar uma gama de alterações metabólicas, que podem ser agrupadas no conceito de Síndrome X, ou Síndrome Metabólica, como proposto por Gerald Reaven em 1988 (Reaven, 1988). Essas alterações teriam como eixo principal, além da obesidade, a resistência à insulina, a dislipidemia e a hipertensão arterial sistêmica (HAS).

A obesidade também está associada a doença cardiovascular (Mcgee, 2005), em parte por influenciar diretamente outros fatores de risco clássicos como a HAS, dislipidemia e diabetes. No entanto, a obesidade também está associada a outras alterações como aumento de fatores pró-inflamatórios (Willerson e Ridker, 2004) e pró-trombóticos (Pradhan, Rifai *et al.*, 2002). Ainda ressaltando o tempo de exposição, encontra-se que a obesidade presente na adolescência é um fator preditivo mais fortemente associado a morbimortalidade do que a obesidade na vida adulta (Must, Jacques *et al.*, 1992).

Além de associada a doenças cardiovasculares e metabólicas, a obesidade também se correlaciona com doenças respiratórias (Davis, Lipsett *et al.*, 2007), doenças gastrintestinais (El-Serag, Ergun *et al.*, 2007; Watanabe, Hojo *et al.*, 2007), câncer (Calle, Rodriguez *et al.*, 2003) e doenças músculo-esqueléticas (Wearing, Hennig *et al.*, 2006).

2.3 Epidemia de Obesidade

Vivemos um aumento das taxas de de obesidade e sobrepeso. Nos EUA, de 1980 a 2003, a prevalência de sobrepeso em adultos mais do que dobrou, de 15% para cerca de 33%, e em crianças mais do que triplicou de 5,5% para 17% (Flegal, Carroll *et al.*, 1998; Flegal, 2005; Ogden, Carroll *et al.*, 2010). O Brasil, mesmo levando-se em conta a peculiar diversidade regional, não foge a regra, apresentando um aumento da prevalência de obesidade em adultos que aumentou de 3% para cerca de 9% no período de 1974-5 a 2002-3 (Monteiro, Conde *et al.*, 2007). Tal aumento ocorreu também na população infantil. Comparando os resultados de diferentes inquéritos populacionais (Estudo Nacional de Despesas Familiares – ENDEF, realizado em 1974-1975 e Pesquisa sobre Padrões de Vida – PPV, realizada em 1996-1997), constatou-se um aumento de 4,1% para 13,9% na prevalência de sobrepeso em indivíduos de 6-18 anos, correspondendo a um incremento relativo desse distúrbio de 239% (Wang, Monteiro *et al.*, 2002).

Tal aumento da obesidade, evidente também nas crianças e adolescentes, oferece uma previsão pessimista para as próximas décadas, uma vez que sobrepeso na infância é importante fator de risco para sobrepeso na vida adulta (Guo, Roche *et al.*, 1994; Magarey, Daniels *et al.*, 2003; Bettioli, Sabbag Filho *et al.*, 2007). Mais ainda, o risco de desenvolver obesidade na vida adulta não é apenas maior em crianças com sobrepeso, mas também naquelas com peso entre o percentil 50 e 74 (Freedman, Khan *et al.*, 2001), quando comparadas às crianças com peso abaixo do percentil 50.

2.4 Programação Metabólica

Nos anos 60, Neel já havia lançado a “Hipótese do Genótipo Pougador” (Neel, 1962), no contexto de estudar a gênese do *diabete melitus* tipo 2, propondo que determinadas populações apresentavam maior propensão à resistência insulínica tanto por seleção quanto por aspectos genéticos. Segundo esse autor, uma mutação aleatória levando à resistência a insulina poderia ser adaptativa e benéfica para indivíduos expostos a ambientes de escassez alimentar. A partir do processo de seleção natural, haveria uma conseqüente transmissão dessa característica para as gerações seguintes. No entanto, evidências atuais sobre interações entre gene e ambiente demonstram que considerações sobre efeitos puramente genéticos e independentes do meio não têm um correlato biológico significativo. A atual epidemia, como descrita acima, é um exemplo desse fenômeno, como fica evidente pela rapidez de sua evolução. Logo, a mudança da base genética populacional não oferece uma explicação suficiente para o problema, havendo necessidade de contextualizar também as interações do perfil genético com as variações ambientais.

Um grupo de pesquisadores demonstrou, através de estudos clínicos, a influência dos diferentes tipos de dieta láctea sobre o crescimento somático, imune e o desenvolvimento neuropsicomotor do recém-nascido (Lucas, Brooke *et al.*, 1990; Lucas, Morley *et al.*, 1998), propondo o uso do termo “programação” nesse contexto. Alinhavado por Dörner e colaboradores (Dörner, 1974) mas amplamente explorado por Alan Lucas, esse termo se refere ao conceito no qual um insulto ou estímulo aplicado num período crítico ou sensível pode ter efeitos duradouros ou persistentes sobre a estrutura ou função de um organismo (Lucas, 1991). Assim, o

desenvolvimento e a gravidade de diversas condições mórbitas na vida adulta dependem da interação entre a vulnerabilidade genética do indivíduo, a exposição a fatores ambientais adversos, assim como da duração e período de ocorrência desses eventos estressantes (Charmandari, Tsigos *et al.*, 2005). Uma vez que a vida pré-natal, a infância e a adolescência são períodos críticos caracterizados por alta plasticidade metabólica, a exposição a um estímulo significativo nessas idades pode ter grandes conseqüências de ordem organizacional e produzir alterações persistentes no funcionamento do organismo.

2.5 Origem Precoce da Obesidade

Evidências epidemiológicas sugerem que a obesidade pode ter sua origem programada em fases precoces da vida. Sabe-se, por exemplo, que a obesidade materna está associada com aumento de risco para obesidade da prole na vida adulta (Tequeanes, Gigante *et al.*, 2009). Estudos de herança genética demonstram que o IMC das crianças se correlaciona mais diretamente com o IMC materno do que com o paterno, sugerindo que, em adição a influências genéticas, o ambiente intra-útero contribui para o desenvolvimento da obesidade nos filhos (Danielzik, Langnase *et al.*, 2002). Na mesma linha, Deierlein *et al.* encontrou que tanto o IMC prévio à gestação, quanto o ganho de peso durante a gravidez estavam associados a maior ganho de peso nos primeiros 6 meses de vida (Deierlein, Siega-Riz *et al.*, 2010). Fato semelhante foi encontrado por Kim *et al.*, o qual mostrou que a epidemia de obesidade vem afetando também pré-escolares e mesmo lactentes menores de 1 ano de idade (Kim, Peterson *et*

al., 2006). Por outro lado, a restrição de crescimento intra-uterino também se mostra capaz alterar a composição corporal, com aumento da adiposidade e maior risco de obesidade na vida adulta, como mostrado por Ravelli et al já em 1976 (Ravelli, Stein *et al.*, 1976).

Além disso, evidências existem de que o ambiente pós natal, principalmente em relação a alimentação, pode ser crítico para o desenvolvimento da obesidade. O aleitamento materno está associado a um padrão de crescimento diferente daquele oferecido pela alimentação por fórmula, estando ligado a um menor risco de obesidade de maneira dose dependente, como mostrado em uma meta-análise que compilou dados de 17 trabalhos (Harder, Bergmann *et al.*, 2005). Ainda há muita especulação sobre como esse efeito de programação ocorre, mas os mecanismos propostos passam pela alteração da saciedade (Wright, Fawcett *et al.*, 1980; Muhlhausler, Adam *et al.*, 2007), do crescimento do tecido gorduroso (*early fat rebound*) (Bergmann, Bergmann *et al.*, 2003) e do *milieu* hormonal, com exposição à insulina diferenciada entre os dois grupos de crianças (alimentadas com fórmula versus aleitamento materno) (Mandic, Piricki *et al.*, 2010).

2.6 Superalimentação Neonatal

Por superalimentação precoce entende-se qualquer alimentação em excesso nas fases iniciais da vida. Por excesso entende-se qualquer quantidade que seja maior que a necessária para manter a taxa de crescimento normal. Tal período, como exposto acima, é considerado crítico para o desenvolvimento de diversos órgãos e sistemas,

portanto acredita-se que esse excesso nutricional possa deixar marcas duradoras, através do fenômeno de programação.

Uma boa gama de estudos, a maioria baseada em modelos experimentais animais, explora o assunto. O consenso atual é de que o *milieu* hormonal induzido por essa sobrecarga nutricional altera a ontogenia das vias hipotalâmicas, levando a alteração do controle do balanço energético, através do aumento do apetite e redução do gasto energético (Plagemann, Harder *et al.*, 2008).

No início da década de 70, Dörner demonstrou que os hormônios são organizadores ambiente-dependentes dos sistemas neuroendócrinos que regulam os processos fundamentais da vida. Quando presentes em concentrações fora do padrão fisiológico, induzidas por alterações do ambiente intra-uterino ou neonatais, os hormônios poderiam agir como "teratógenos endógenos funcionais" levando à "mal-programação" do sistema neuroendócrino-imune, com conseqüentes desordens desenvolvimentistas e doenças durante a vida (Dorner, 1975).

As primeiras evidências surgem do estudo de gestações complicadas pela diabetes (tipo 2 ou gestacional), que leva a um importante aumento da insulina fetal. O mecanismo desse aumento se deve a passagem aumentada da glicose materna através da placenta, e conseqüente aumento da secreção de insulina pelo feto, no que se pode chamar de "superalimentação" pré-natal. Evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais mostram que esses indivíduos possuem maior risco de desenvolverem sobrepeso, obesidade e diabetes. Interessantemente, esse fato parece estar mais associado com os níveis de insulina perinatais do que com o baixo ou alto peso ao nascer (Dorner e Plagemann, 1994; Silverman, Metzger *et al.*, 1995).

Outros modelos animais de indução de hiperinsulinemia se baseiam na manipulação direta ou indireta da nutrição no período de lactação do rato, que

corresponde às suas três primeiras semanas de vida. O modelo de manipulação indireta usa do artifício de reduzir a ninhada de ratos, de modo a propiciar uma menor competição pelo leite materno e conseqüentemente uma maior ingestão de leite (McCance, 1962). Já o direto envolve a administração de dietas diretamente aos filhotes, manipulando tanto a qualidade, quanto a quantidade do alimento (Hall, 1975). Apesar das diferenças metodológicas, os principais resultados são basicamente os mesmos, e envolvem o aumento da secreção de insulina e leptina (tanto no período de superalimentação, quanto pelo resto da vida, mesmo que recebendo dieta normal), aumento do ganho de peso e da adiposidade e hiperfagia (Plagemann, Harder, Rake *et al.*, 1999; Srinivasan, Dodds *et al.*, 2008; Srinivasan, Mitrani *et al.*, 2008).

A insulina, como será vista mais abaixo, tem importante papel regulatório do consumo alimentar. Isso somado ao fato de que ela é um potente estimulador da formação de suas próprias vias neuronais de controle, levou à investigação de seu papel na programação dessas vias. De fato, os modelos de indução de superalimentação neonatal persistentemente induzem comportamento alimentar hiperfágico e modificações da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle do comportamento alimentar, como a Galanina (Plagemann, Harder, Rake *et al.*, 1999), o neuropeptídeo Y (Plagemann, Harder *et al.*, 1998; Plagemann, Harder, Melchior *et al.*, 1999), Resistina (Wilkinson, Wilkinson *et al.*, 2005) e POMC (Proopiomelanocortina) (Srinivasan, Mitrani *et al.*, 2008; Plagemann, Harder *et al.*, 2009).

2.7 Balanço Energético e comportamento alimentar

A alimentação é essencial para a sobrevivência por fornecer o substrato energético tão necessário a vida. Por isso mesmo sua regulação é realizada de forma intensa, por uma série de vias neuroendócrinas que muitas vezes se sobrepõem conferindo-lhes uma grande redundância.

De uma maneira geral, pode-se dividir o comportamento alimentar em homeostático e hedônico. O primeiro está relacionado a manutenção dos processos homeostáticos do organismo, monitorando os nutrientes circulantes e o nível das reservas e "decidindo" pela alimentação quando necessária. Já o segundo envolve aspectos de prazer e recompensa relacionados ao consumo de alimentos.

Existe crescente consenso na literatura de que a variação de consumo energético observada na população em sua maior parte provém de fatores que estimulam ou aumentam a sensibilidade dos sistemas hedônicos de alimentação (Berthoud, 2004; Blundell e Finlayson, 2004; Yeomans, Blundell *et al.*, 2004). Os sistemas não hedônicos de alimentação são considerados essenciais, onde pouco se conhecem "defeitos" que levem a obesidade, a não ser em casos relativamente excepcionais (Hellstrom, Geliebter *et al.*, 2004). Mais ainda, a literatura corrente acredita que estes dois sistemas teriam sido moldados evolutivamente a fim de contemplar uma grande variabilidade na disponibilidade de alimentos. Em essência, serviriam principalmente para proteger o organismo de períodos de redução de oferta, sendo menos adequados para enfrentar a atual "crise de excesso" que estamos vivenciando.

2.7.1 Regulação do Comportamento Alimentar

Como exemplo ilustrativo da importância do comportamento alimentar, sabe-se que ratos mesmo tendo o tronco encefálico isolado continuam a regular a ingestão alimentar e a demonstrar respostas afetivas aos alimentos palatáveis (Grill e Kaplan, 2001; 2002).

Basicamente, o comportamento alimentar pode ser dividido em diferentes fases para melhor compreensão de seus mecanismos: na fase de iniciação, o “valor” de um objetivo alimentar disponível ou o estado interno de alguma maneira atraem a atenção do indivíduo para a alimentação. A presença de um estímulo direto do alimento como a visão ou o olfato podem disparar a fase de iniciação sem necessariamente haver a presença de um estado interno adjuvante. Uma vez que a atenção seletiva é alcançada e a motivação para a ingestão alimentar é grande, inicia-se a fase de procura. Este comportamento requer planejamento, aprendizado e memória e depende essencialmente de processos corticais cognitivos. A fase de consumo começa quando o alimento é finalmente presente e ingerido. Embora essa fase envolva uma série de comportamentos estereotipados, também é caracterizada pela degustação dos alimentos ingeridos e de seus nutrientes a nível cefálico e gastrointestinal, assim como pela formação de associações entre os vários atributos sensoriais do alimento. Na sequência, tomam parte da ação os mecanismos de saciedade, que por fim, levam ao término da refeição, que inclui o fim do consumo *per se* (Berthoud, 2002).

Os sistemas de aferência de informação para o cérebro em relação ao alimento incluem estímulos externos, como as aferências visuais, olfativas, auditivas e táteis, e estímulos internos, que subdividem-se em pré-gástricos (principalmente

sabor), gástricos (distensão) e pós-gástricos (ou pré-absortivos). Há ainda estímulos pós-absortivos, que dividem-se em (a) mecanismos de transporte de nutrientes e a liberação de hormônios locais como a colecistocinina (CCK), agindo através da circulação sanguínea ou de nervos sensoriais viscerais; (b) nutrientes, metabólitos e hormônios agindo em sensores do sistema porta hepático, como a glicose; (c) passos de processamento metabólico e seus mensageiros locais e hormônios agindo nos sensores do fígado, como o ATP e o glucagon e (d) metabólitos, hormônios e outros fatores originários de vários tecidos circulando no sangue ou no sistema linfático e ativando sensores diretamente no cérebro, como a glicose, aminoácidos, insulina e leptina (Berthoud, 2002).

2.7.2 Sistemas neurais envolvidos na regulação do comportamento alimentar

O hipotálamo é uma estrutura chave na regulação do comportamento alimentar. Em mamíferos, esta estrutura consiste em mais de 40 áreas e núcleos distintos, muitos deles podendo ser subdivididos em subnúcleos. Além de controlar a alimentação, o hipotálamo está envolvido em outros processos como a ingestão hídrica, comportamentos defensivos e agressivos, comportamento sexual, regulação da temperatura corporal e defesa imunitária. No que tange ao comportamento alimentar, vários de seus núcleos recebem aferências e enviam eferências a diversas partes do encéfalo e medula espinhal, porém os núcleos mais intensamente envolvidos nesse controle são o núcleo arqueado, o hipotálamo lateral e ventromedial e o núcleo paraventricular.

O núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) é uma região que recebe aferências de outros núcleos como o núcleo periventricular e área pré-óptica medial, assim como do hipotálamo lateral (Guan, Saotome *et al.*, 2001) (Horvath, Diano *et al.*, 1999). Aferências extra-hipotalâmicas incluem o córtex (Defalco, Tomishima *et al.*, 2001) a amígdala, o núcleo próprio da estria terminal e núcleos do tronco encefálico como o núcleo parabraquial e o núcleo do trato solitário (Li, Chen *et al.*, 1999). Seus neurônios são anatomicamente posicionados próximos a capilares fenestrados na base do hipotálamo, o que os coloca em contato com importantes hormônios como a leptina (Glaum, Hara *et al.*, 1996), o hormônio do crescimento (Kamegai, Hasegawa *et al.*, 1996; Kamegai, Tamura *et al.*, 2000), esteróides sexuais (Tong, Zhao *et al.*, 1990), insulina e glicose (Muroya, Yada *et al.*, 1999) e grelina (Guan, Okuda *et al.*, 2008), para os quais possuem receptores (Benoit, Schwartz *et al.*, 2000; Cone, Cowley *et al.*, 2001). Esse núcleo envia sinais a outros núcleos do hipotálamo e para sítios extra-hipotalâmicos como núcleos talâmicos mediais, núcleo próprio da estria terminal, núcleos da rafe, substância cinzenta periaquedutal e núcleo parabraquial lateral. Dois subtipos de neurônios foram identificadas no ARC, ambos contendo o neurotransmissor inibitório GABA (Hentges, Nishiyama *et al.*, 2004). Uma das populações neuronais expressa a proopiomelanocortina (POMC) e o peptídeo relacionado à cocaína e à anfetamina (CART), e quando ativada leva a uma diminuição do apetite e aumento do gasto energético (Ellacott e Cone, 2004; Cone, 2005). Em contraste, a outra população de células, contendo neuropeptídeo Y (NPY) e Proteína Relacionada ao Gene Cutia (AGRP), leva a uma resposta orexigênica e menor gasto energético (Clark, Kalra *et al.*, 1984). Tanto os neurônios contendo POMC quanto os neurônios contendo NPY expressam receptores para leptina e grelina (Baskin, Breininger *et al.*, 1999; Riediger, Traebert *et al.*, 2003). A leptina aumenta a

atividade dos neurônios POMC e inibe neurônios NPY (Baskin, Hahn *et al.*, 1999), enquanto a grelina age fazendo o oposto (Traebert, Riediger *et al.*, 2002).

O hipotálamo lateral, por sua vez, recebe aferências de várias áreas corticais e límbicas como a amígdala, o hipocampo e o núcleo accumbens, assim como dos núcleos paraventricular e arqueado (especialmente de neurônios contendo NPY na área perifornicial). Ele se projeta para todo o córtex, hipocampo, amígdala, gânglios da base, tálamo, ponte e medula espinhal, assim como para os outros núcleos do próprio hipotálamo. Nesse núcleo encontram-se duas populações de neurônios que contêm tanto orexina (Chen, Dun *et al.*, 1999) como o hormônio concentrador de melanina (MCH), outro potente estimulante da ingestão alimentar (Bittencourt, Presse *et al.*, 1992).

O núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) possui alta expressão de receptores para a leptina e tem sido descrito como o núcleo responsável pela mediação das ações da leptina na homeostase (Mercer, Hoggard *et al.*, 1996). Eferências do VMH são na sua maioria excitatórias, aumentando a atividade das células POMC, e durante o jejum esses estímulos diminuem (Sternson, Shepherd *et al.*, 2005). Infusões de NPY nesse núcleo aumentam o consumo alimentar, e o jejum aumenta os níveis de NPY nessa região (Kalra, Dube *et al.*, 1999).

O núcleo paraventricular do hipotálamo recebe aferências de outros núcleos hipotalâmicos como a área pré-óptica medial, órgão subfornicial e núcleos arqueado, dorsomedial e lateral. Além disso, aferências do tronco encefálico como o núcleo do trato solitário (principalmente noradrenérgicas, (Sawchenko e Swanson, 1982), locus ceruleus e núcleo da rafe (principalmente serotoninérgicas, assim como do núcleo próprio da estria terminal e amígdala também atingem o PVN (Sawchenko e Swanson, 1983). As eferências endócrinas mais reconhecidas desse núcleo são provenientes dos

neurônios magnocelulares para a pituitária posterior, secretando ocitocina e vasopressina, assim como dos neurônios parvocelulares secretando CRH e TRH. Eferências não-endócrinas incluem a maioria dos outros núcleos hipotalâmicos e núcleos autonômicos pré-ganglionares no mesencéfalo, prosencéfalo e medula espinhal, assim como neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos innervando o pâncreas (Jansen, Hoffman *et al.*, 1997) e estruturas diencefálicas e telencefálicas como o tálamo e a amígdala.

Outras estruturas são também importantes na regulação do comportamento alimentar. Por exemplo, o córtex sensório-visceral dissemina importantes informações nutricionais da cavidade oral e trato gastrointestinal para áreas corticais envolvidas na geração de representações e associações polimodais, tanto diretamente como através da amígdala para processamento emocional ou através do estriado ventral para aspectos motivacionais. O córtex olfatório primário tem propriedades semelhantes em relação ao olfato, com a possibilidade de estocagem de memórias através da formação hipocampal. O hipocampo, por sua vez, além de envolvido no aprendizado e memória dos aspectos relacionados ao comportamento alimentar como a qualquer outro comportamento, também parece ter um papel específico na alimentação (Clifton, Vickers *et al.*, 1998). A amígdala é a única região cerebral além do córtex gustatório e do hipotálamo lateral a receber aferências gustatórias diretas do núcleo do trato solitário e do núcleo parabraquial, mas também recebe informações provenientes de áreas corticais, hipotalâmicas, hipocampais e do estriado ventral, sendo responsiva a uma variedade de peptídeos e neurotransmissores envolvidos no comportamento alimentar como os opióides (Giraud, Kotz *et al.*, 1998) e a enterostatina (Lin e York, 2004).

Estruturas do tronco encefálico integram as grandes vias de aferências víscero-sensoriais e eferências motoras, sendo que suas áreas mais estudadas em relação ao comportamento alimentar são o núcleo do trato solitário (NTS) e área postrema e o núcleo parabraquial. O NTS e a área postrema são extremamente hábeis para detectar hormônios e outros fatores circulantes, além de receberem aferências dos receptores víscero-sensoriais e gustatórios via neurônios aferentes primários vagais, glossofaríngeos, faciais e trigeminais, possuindo uma população significativa de neurônios expressando POMC e sendo também responsivos à urocortina (Grill, Markison *et al.*, 2000).

2.7.3 O sistema mesolímbico e a regulação do apetite

Mesmo na ausência de fome, o prazer e a sensação de recompensa associados ao alimento podem estimular o consumo. O núcleo accumbens tem sido amplamente relacionado a comportamentos direcionados e aprendizado instrumental apetitivo (Corbit, Muir *et al.*, 2001; Baldwin, Sadeghian *et al.*, 2002). O desejo ou a saliência da comida nesse tipo de tarefa é determinado pelo estado nutricional e pelo valor hedônico do alimento, assim como pela interação dos dois fatores (Berridge, 1991). Além disso, evidências recentes sugerem que a atividade dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) que se projetam para o núcleo accumbens pode ser modulada por sinalizadores do estado energético como a leptina, a insulina e a grelina (Abizaid, Liu *et al.*, 2006; Jerlhag, Egecioglu *et al.*, 2006;

Figlewicz, Macdonald Naleid *et al.*, 2007), revelando a potencial importância desse sistema na regulação da ingestão alimentar.

De acordo com Berridge e Robinson, a saliência (“querer”) e a sensação hedônica (“gostar”) relacionadas ao alimento representam processos distintos no circuito da motivação e da recompensa (Berridge e Robinson, 1998). Segundo essa teoria, os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) projetando-se para o núcleo acumbens determinam seletivamente o nível de saliência do alimento, enquanto sensação hedônica ligada ao alimento palatável está associada com sistemas opióides e GABA/benzodiazepínicos difusos distribuídos nos núcleos gustatórios do tronco encefálico, no estriado ventral e possivelmente em outras áreas como a amígdala, o córtex límbico e o hipotálamo. Realmente, antagonistas opióides injetados no núcleo acumbens reduzem o consumo de alimentos doces mas não de substâncias menos palatáveis (Zhang, Balmadrid *et al.*, 2003). No entanto, interessantes estudos em humanos utilizando tomografia por emissão de pósitrons (*PET-scan*) mostram que o consumo alimentar associa-se à liberação de Dopamina no estriado dorsal, e que a quantidade liberada do neurotransmissor se correlaciona com o grau de prazer associado à alimentação (Small, Jones-Gotman *et al.*, 2003), sugerindo que a regulação dos mecanismos hedônicos pode ser mais complexa.

Vários estudos demonstram que a administração de canabinóides endógenos estimula a ingestão alimentar em modelos animais (Koch e Matthews, 2001). Esse efeito é possivelmente mediado via receptor canabinóide tipo 1 (CB1) no hipotálamo, onde se co-localiza com a CART, MCH e orexina. É interessante notar que há receptores CB1 também em adipócitos onde eles parecem estimular a lipogênese (Cota, Marsicano *et al.*, 2003).

3 JUSTIFICATIVA

Em linhas gerais o presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento sobre fatores envolvidos na gênese da obesidade, sob o prisma das teorias que compõem o campo de estudo “DOHaD” (Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença), devido à importância dos assuntos em estudo (obesidade, comportamento alimentar e alteração de fenótipo por uma intervenção precoce) para a determinação dos riscos de saúde da população, e do reconhecimento da necessidade de maiores estudos sobre o assunto.

4 OBJETIVOS

Objetivos Gerais

- Avaliar o impacto do excesso alimentar durante a vida precoce sobre a saúde do adulto.

Objetivos Específicos

- Avaliar o impacto da superalimentação neonatal sobre:
 - Comportamento alimentar
 - Não Hedônico : basal, estimulado por jejum e após isolamento social.
 - Hedônico: basal, preferência e em resposta a um teste de provocação por pinçamento de cauda (*Tail-Pinch*)
 - Sistema Dopaminérgico Mesolímbico, medindo a Tirozina Hidrozilase (TH) nos núcleos Accumbens e Área Tegmentar Ventral.

5 METODOLOGIA.

5.1.1 Desenho Experimental

Projeto de desenho experimental, comparando grupo submetido a intervenção de redução da ninhada durante a idade de lactação, com grupo controle com ninhada padronizada em 8 filhotes.

5.1.2 Linha do tempo

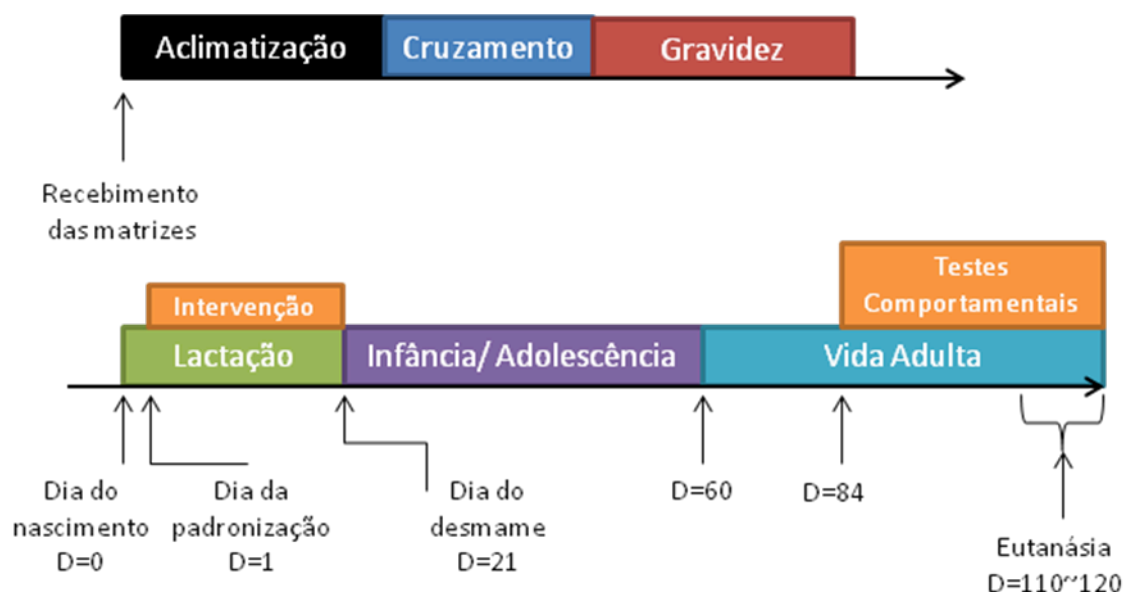


Figura 1: Linha do tempo com o desenho experimental

5.2 Geração das ninhadas e protocolo de superalimentação neonatal

Ratos Wistar fêmeas e machos com 60 dias de vida foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS e deixados habituar por duas semanas na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, antes de qualquer intervenção. Os animais permaneceram em caixas-moradia padrão, compostas de *plexiglas*, em grupos de 2-4 animais de mesmo sexo. As moradias eram forradas com uma camada de maravalha, que era trocada a cada 2-3 dias. Água e ração padrão eram fornecidas *ad libitum*. Condições ambientais foram mantidas sob controle, com temperatura de 25,0 +/- 2°C e umidade de 35%. Os animais foram submetidos a um ciclo normal claro/escuro de 12 horas, luzes acesas às 7:00 AM. O acasalamento foi obtido colocando-se 1 macho em cada caixa com duas fêmeas por um período de sete dias. Após o acasalamento as fêmeas foram colocadas em caixas unitárias até o nascimento da ninhada e desmame. O dia do nascimento foi considerado dia 0. Ao nascimento, as ninhadas foram randomizadas em grupo de ninhada reduzida (SL) e grupo controle (NL). Para reduzir a interferência com o cuidado materno, nenhuma manipulação foi realizada até o dia 1 de vida. Neste dia, as ninhadas SL foram reduzidas para 4 filhotes (3 machos e 1 fêmea) e as ninhadas NL foram padronizadas em 8 filhotes (3 a 5 machos). Utilizaram-se ao todo 25 matrizes fêmeas e 10 machos, que deram origem a 18 ninhadas com pelo menos 8 filhotes (três ninhadas foram excluídas por apresentarem menos de 8 filhotes e quatro matrizes não engravidaram). Oito ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes e outras 10 ninhadas foram submetidas à redução para 4 filhotes. O número total de animais obtido foi de 54, sendo 26 NL e 28 SL. O peso ao nascer não foi medido para

evitar manipulação excessiva dos animais. O ganho de peso durante a gestação, e o número de filhotes das ninhadas não foi diferente entre os grupos (dados não mostrados).

Os filhotes foram expostos à superalimentação até o dia do desmame, aos 21 dias de vida, quando tanto os animais SL quanto os NL foram desmamados e separados entre machos e fêmeas, sendo mantidos em grupos de 2-4 animais por caixa (modelo adaptado de (Plagemann, Heidrich *et al.*, 1992; Lopez, Tovar *et al.*, 2007). Os testes comportamentais ocorreram partir do 84º dia de vida. Quando realizado mais de um teste comportamental, respeitou-se uma semana de intervalo entre eles. Os tratamentos dos animais foram realizados seguindo as recomendações do International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Apenas animais machos foram utilizados para os experimentos na vida adulta.

5.3 Acompanhamento do crescimento após o desmame, e quantificação da adiposidade abdominal.

Os ratos tiveram seu peso aferido semanalmente a partir do dia 21, para estudo do seu padrão de ganho de peso, utilizando-se balança digital com precisão de 0,01g e modo automático de pesagem de pequenos animais, o qual realiza 3 medidas num período de 10 s., e apresenta a média destas como resultado. Para minimizar o estresse e a manipulação excessivos, tal medida foi realizada uma vez a cada 7 dias, no momento da limpeza/manutenção da caixa moradia.

A quantificação da adiposidade abdominal foi feita após o sacrifício do animal (figura 1), por meio de dissecação dos depósitos abdominais de gordura perirenal e peri-gonadal, e o resultado foi expresso em porcentagem do peso corporal (Fernandez, Molto *et al.*, 2009).

5.4 Avaliação do Consumo Alimentar.

A avaliação do consumo de ração padrão foi realizada nas condições basais de moradia, e em resposta a diferentes intervenções ambientais e de estresse, como o jejum, o isolamento social e a provocação com *tail-pinch* (pinçamento da cauda). Também se avaliou a preferência entre alimento doce e ração padrão, sendo os animais habituados ao alimento doce antes de serem testados. Os testes sempre iniciaram no período da tarde (em torno de 15h), correspondendo ao início do terço final do ciclo claro. Os detalhes de cada teste encontram-se abaixo.

5.4.1 Consumo de ração padrão em condições basais

O consumo de alimento padrão habitual foi inicialmente avaliado na caixa moradia, com os animais acomodados em seus grupos habituais de 2 a 4 ratos, em um período de 24h, colocando-se uma quantidade conhecida de ração, e medindo-se o

restante após decorrido o tempo estabelecido. O resultado obtido foi então dividido pelo número de ratos co-habitando a caixa, dando o resultado final em consumo médio por caixa, por rato.

5.4.2 Avaliação do consumo alimentar após isolamento social.

Os ratos foram colocados isoladamente em caixas-moradia idênticas às habituais, e após um período de habituação de 30 min. colocou-se uma quantidade conhecida de ração, e em 24h mediu-se o restante. Para comparação com a medida basal de consumo em grupo, foi calculado a média do consumo dos ratos que constituíam cada grupo de co-habitação.

5.4.3 Avaliação da hiperfagia de rebote após jejum.

Para avaliar o efeito do jejum, um teste de provocação de consumo homeostático, os animais foram primeiramente isolados conforme descrito no item anterior, e então privados da oferta de ração padrão por um período de 24h. O consumo então foi medido nas 24h seguintes à re-oferta de ração padrão.

5.4.4 Avaliação do consumo de alimento doce.

5.4.4.1 Habituação e consumo basal

Para medir o consumo de alimento doce em situação basal, o animal foi colocado em caixa retangular semelhante à caixa moradia, por 5 min., na presença de 10 unidades de alimento palatável, doce (Froot Loops® , Kellogs, 3,78 kcal/g), sendo a quantidade consumida quantificada com base num protocolo que avalia o número de rosquinhas consumidas e suas frações (em incrementos de 1/8), conforme realizado previamente (Silveira, Portella *et al.*, 2004). Para evitar viés de observação, a contagem foi sempre realizada pela mesma pessoa. Para evitar o efeito de neofobia, pelo qual o animal evita o consumo de alimentos desconhecidos, realizou-se uma habituação com a oferta do alimento doce, nas mesmas condições experimentais, e também com a oferta de 3 rosquinhas/rato na caixa moradia quando do retorno à colônia.

5.4.4.2 Teste de preferência de alimento doce versus ração padrão

Para a medida de preferência alimentar, comparou-se o consumo de alimento doce em relação ao consumo de ração padrão (Nuvital, densidade calorica = 2,95

kcal/g, proteínas = 22 a 22,5%, gorduras = 4,4 a 4,6%, carboidratos = 53 a 55%) colocando-se os animais em isolamento, e ofertando ao mesmo tempo os dois alimentos por um período de 24h.

5.4.5 Teste de resposta ao tail-pinch

O *Tail-pinch* ou pinçamento de cauda é um teste no qual se avalia a resposta alimentar induzida por uma situação de estresse leve, breve, que consiste em pinçar a região localizada a cerca de 1cm da base da cauda do rato, com um prendedor de roupa feito de madeira. Vários estudos demonstram que a partir desse estresse ocorre uma ativação das vias mesolímbicas, com liberação de dopamina no núcleo *accumbens* (Brake, Zhang *et al.*, 2004), estando associado à indução de comportamento estereotipado e alimentação (Samarghandian, Ohata *et al.*, 2003). Nesse estudo realizou-se a pressão por 1min. e mediu-se o consumo de alimento doce (Froot loops®) por um período de 1h. Para efeito de comparação, o grupo de animais não exposto ao pinçamento foi submetido apenas a uma breve manipulação, que consistiu em carregar o animal com as mãos por alguns segundos.

5.5 Locomoção em campo aberto.

Utilizou-se de aparato de caixa de locomoção automatizada modelo EP-149IR da marca Insight Equipamentos Científicos LTDA (Ribeirão Preto, SP). Os testes foram realizados em 2 dias, sendo o primeiro considerado treino para habituação à novidade, com duração de 5min., e o dia seguinte considerado o dia de teste, com duração de 30min. Avaliou-se locomoção total e sua qualidade (locomoção central versus periférica), bem como a resposta à novidade e eventual habituação (comparando-se os 5 min do treino, com os 5min iniciais do teste).

5.6 Avaliação de resistência tecidual periférica à insulina.

Na idade adulta, um grupo de animais foi injetado com insulina na dose de 5u/Kg, no estado de jejum (4h), ou com solução salina. Após 15min da injeção, os ratos foram decapitados rapidamente com guilhotina, e coletados a porção média do músculo gastrocnêmio e o sangue de tronco. O sangue foi processado para extração do plasma com centrifugação a 3000 rpm em tubos contendo EDTA, e estocado em refrigeração a -20°C. A biópsia de músculo foi armazenada a -80°C até ser processada.

O plasma foi posteriormente analisado quanto a concentração de glicose, utilizando-se de kit comercial Glicose HK Liquiform (Labtest). As porções de músculo foram analisadas quanto à relação da quantidade de AKT total e AKT fosforilado através de técnica de *Western-Blot*, conforme descrito abaixo. As quantificações foram

realizadas no Laboratório 37 do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo autor desta tese.

5.7 Obtenção das amostras de tecido encefálico

Animais foram submetidos a jejum breve de 4h, e então decapitados rapidamente com guilhotina. O encéfalo foi retirado e mergulhado em isopentano mantido sobre refrigeração com gelo-seco. Após o congelamento, a peça foi mantida em gelo-seco até ser armazenada em freezer de -80°C para posteriormente ser processada.

Para microdissecção das estruturas VTA e Núcleo Accumbens, utilizou-se de aparato de corte criostático, e realizando-se 3 a 4 cortes de 160-200µm, de onde obteve-se *punchs* bilaterais de 1 mm de diâmetro, nas áreas de interesse. Como orientação utilizou-se o atlas Swanson (Swanson, 2004).

5.8 Western Blot

As amostras de músculo foram homogenizadas em tampão de lise, sendo feita extração da porção citosólica na presença de inibidores de protease (Complete, Roche) e de fosfatase (Phostop, Roche). A proteína total foi quantificada utilizando-se um kit BCA e albumina bovina como padrão (Sigma-Aldrich). Amostras contendo

20µg de proteína, e um padrão de peso molecular (Magic Marker, Invitrogen) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - gradiente 4-14% (Invitrogen), e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas em tampão Tris-Base contendo leite desnatado a 5% e Tween-20 1%. As membranas foram incubadas com os anticorpos contra TH (Sigma-Aldrich) 1:8000, pan-AKT (Cell Signaling) 1:2000 e p-AKT (Cell Signaling) 1:2000. A intensidade das bandas foi quantificada por medida da densidade óptica pelo programa ImageJ (National Institute of Health, USA). Resultados foram expressos como a razão entre as proteínas de interesse e a α -Tubulina 1:2000 (Sigma-Aldrich), para amostras do SNC, ou β -actina 1:2000 (Sigma-Aldrich) para as amostras do músculo.

5.9 Análise estatística

Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão da média. As comparações dos testes de resposta ao *tail pinch*, e do desafio com insulina (tanto para glicose quanto medida de AKT muscular), foram realizadas por análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias). As comparações entre dois grupos experimentais (SL x NL), como no caso do teste de consumo de ração padrão, preferência, parâmetros de atividade locomotora e níveis protéicos de TH foram realizadas pelo teste *t* de *Student* para amostras independentes. Para analisar o ganho de peso, foi utilizado o teste de ANOVA de medidas repetidas. Dados foram analisados com o pacote estatístico IBM SPSS Statistics versão 19. Foi considerado o valor “p” igual ou menor 0,05 para significância estatística. O tamanho amostral de cada teste é fornecido na descrição dos

resultados, onde eventualmente alguns animais foram excluídos devido a perda do dado, ou por erro de coleta ou de técnica.

Para cálculo de tamanho de amostra, considerou-se uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,8 desvios-padrão (magnitude de efeito grande), considerando $\alpha = 0,05$ e poder de confiança de 90%, seriam necessários 8 animais por grupo em cada um dos experimentos.

6. RESULTADOS

6.1 Peso e composição corporal

Como visto na Figura 2, todos os ratos ganharam peso com o passar do tempo. Uma ANOVA de medidas repetidas (Tempo X Grupo), mostrou efeito significativo do tempo ($F(1,53)=3730,634$; $p<0,001$; NL n=27, SL n=28). Entretanto uma interação significativa Tempo X Grupo ($F(1,53)=1.912$; $p=0,048$; NL n=27, SL n=28) demonstrou que animais SL apresentam um padrão de ganho de peso diferente do que os ratos NL (Figura 2).

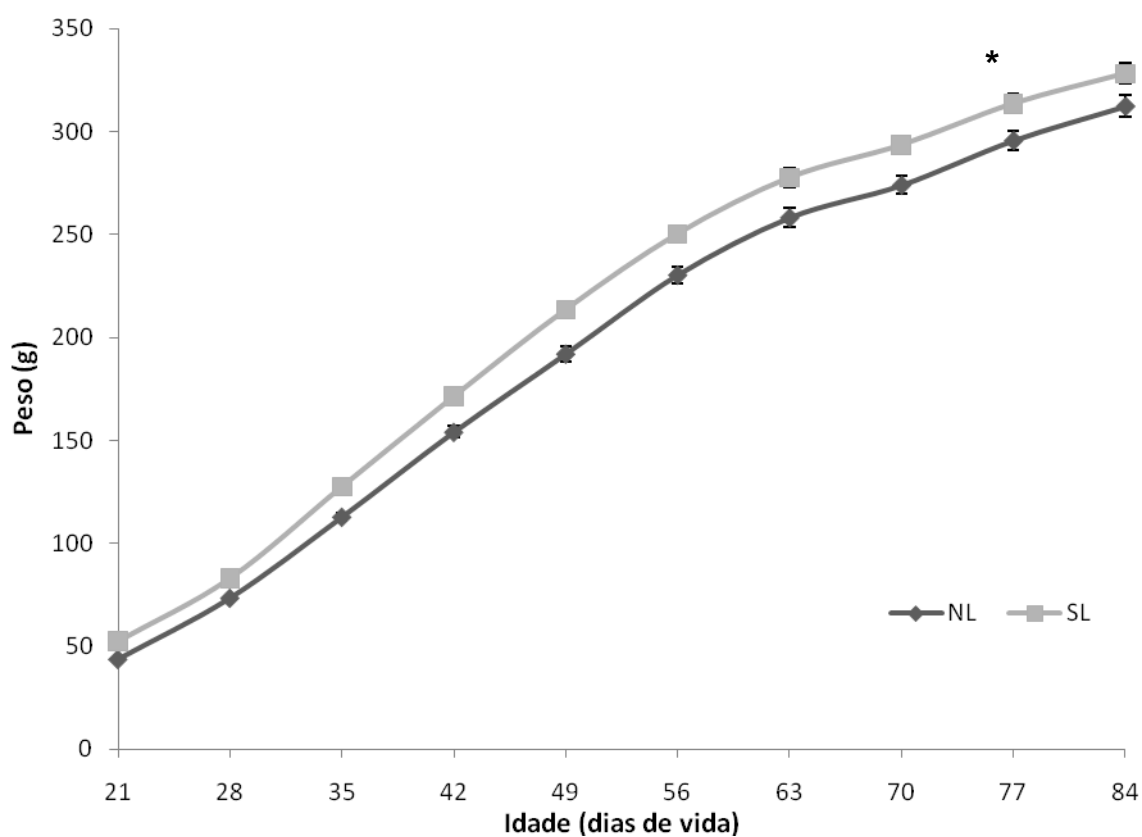


Figura 2: Ganho de peso do desmame ao dia 84 de vida de animais gerados em ninhadas de tamanho normal (NL) comparado com animais de ninhadas de tamanho reduzido (SL).

Quando do sacrifício, ratos SL apresentaram maior acúmulo de gordura abdominal quando comparados aos ratos NL (Teste T de Student, $t=2,186$ $p=0,034$, NL $n=26$, SL $n=28$) (Figura 3).

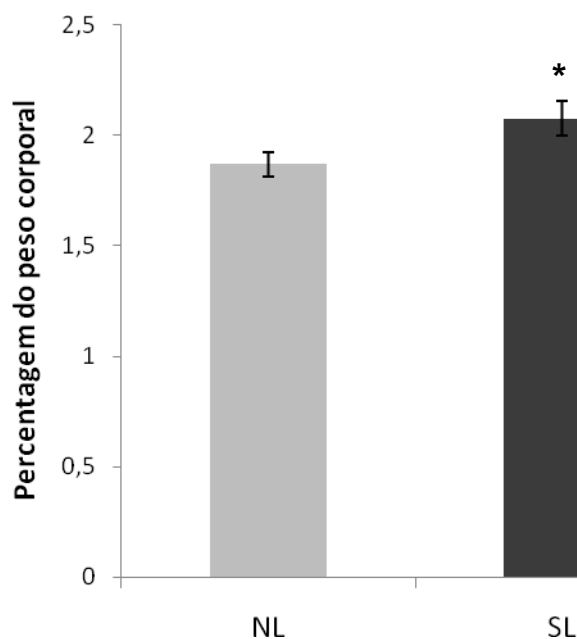


Figura 3 : Índice de adiposidade abdominal de animais gerados em ninhadas de tamanho normal (NL) comparado com animais de ninhadas de tamanho reduzido (SL).

6.2 Teste de locomoção

A distância total percorrida no teste de 30 min. no aparato de campo aberto não foi significativamente diferente entre os (NL=9,88±0,59m, SL=9,83±0.35m; Teste T de Student; $t=0,072$; $p=0,942$; NL $n=26$, SL $n=28$). Entretanto, os ratos SL apresentaram maior tempo de exploração central na seção de treino para habituação

(Teste T de Student, $t=2,153$ $p=0,036$), o que é visto como um sinal de menor ansiedade (Figura 4).

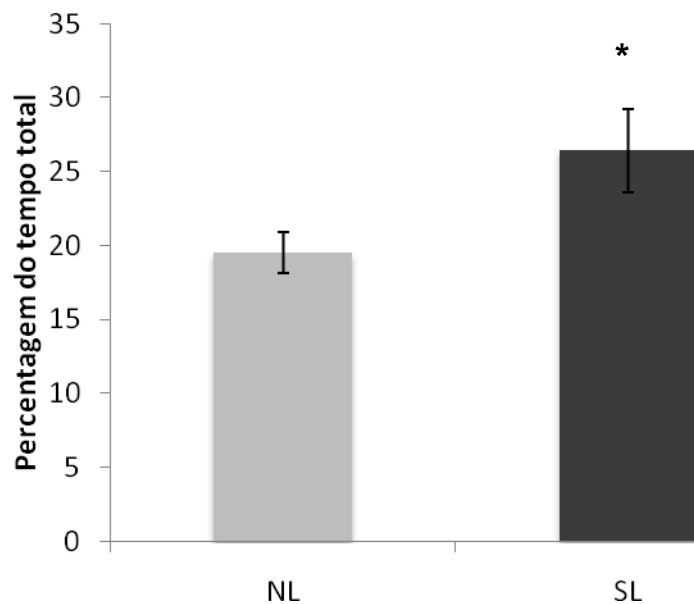


Figura 4: Porcentagem do tempo dispendido na exploração da porção central do aparato de campo aberto.

6.3 Avaliação da resistência periférica a insulina

A resistência periférica à insulina foi avaliada por meio de um teste de desafio com injeção de insulina intraperitoneal e então medidas as respostas da glicemia plasmática e a fosforilação do AKT intracelular no músculo esquelético. A medida de AKT total (Pan-AKT), em teste ANOVA de duas vias (Grupo X Droga) demonstrou

um efeito do grupo ($F(1,24)=4,466$; $p=0,047$), no qual ratos NL tiveram maiores níveis da proteína, sem efeito da droga ($F(1,24)=0,492$ $p=0,491$) ou interação ($F(1,24)=0,241$; $p=0,648$), NL-Salina $n=6$, NL-insulina $n=6$, SL-salina $n=7$, SL-insulina $n=6$). Já o AKT fosforilado (p-AKT) e a sua razão com o Pan-AKT não foram diferentes entre os grupos (p-AKT, grupo : $F(1,23)=2,717$, $p=0,115$; razão p-AKT/Pan-AKT, grupo $F(1,23)=0,015$; $p=0,903$, $n=6$ por grupo). No entanto, como esperado, a fosforilação do AKT foi maior nos animais que receberam a injeção de insulina (razão p-AKT/Pan-AKT, efeito da droga, $F(1,23)=16,312$ $p=0,001$) (Figura 5 a-c), significando que a insulina foi igualmente capaz de fosforilar a AKT entre os grupos.

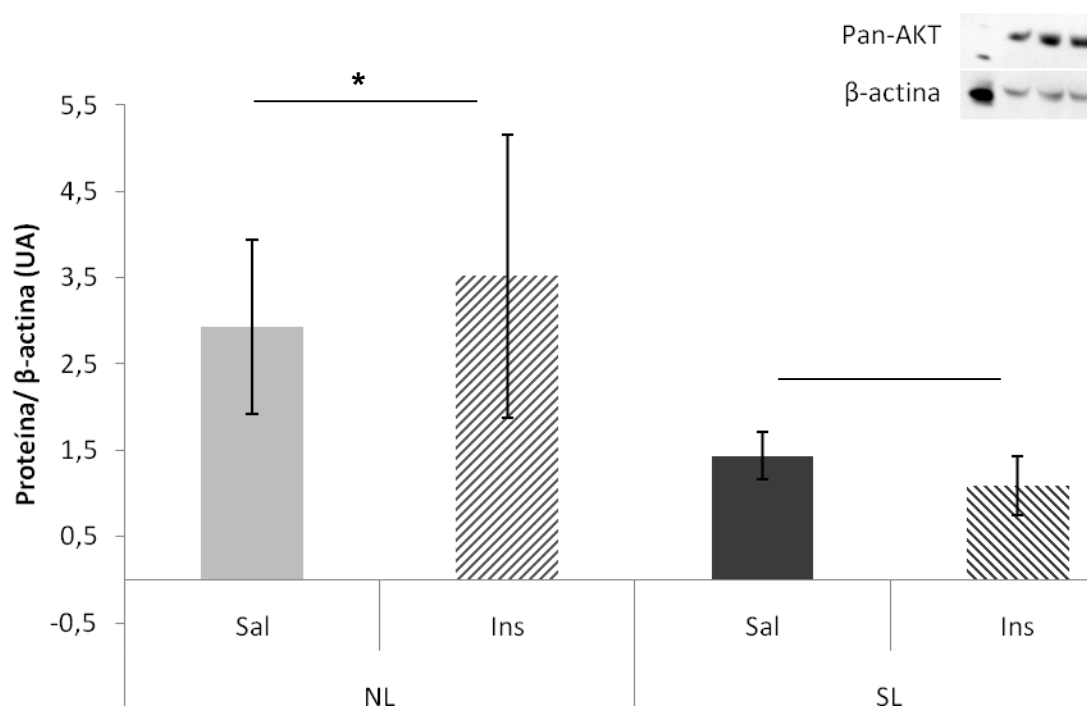


Figura 5a : Níveis de AKT total no músculo após injeção de insulina ou solução salina.

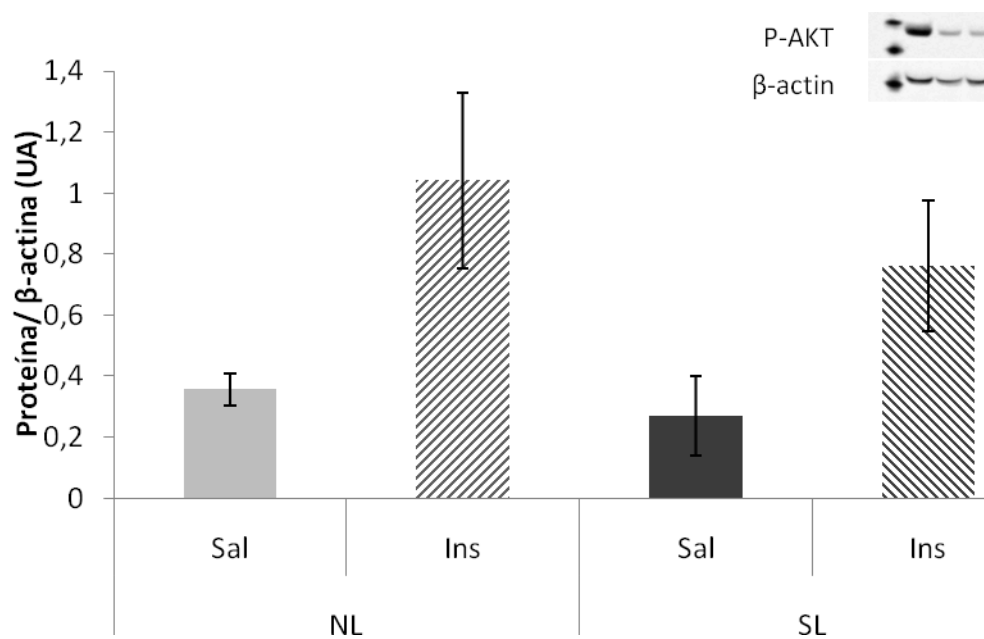


Figura 5b AKT fosforilado no músculo após injeção de insulina ou solução salina

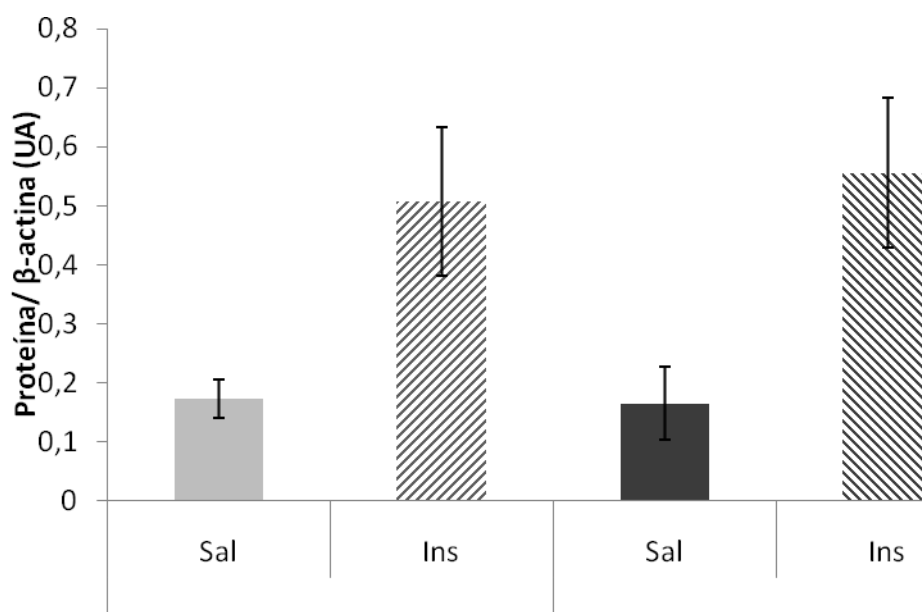


Figura 5c Relação AKT fosforilado/ AKT total no músculo
após injeção de insulina ou solução salina

A resposta da glicose ao desafio com insulina não foi diferente entre os grupos (NL-Sal=155,52±6,8; NL-Ins=82,29±13,65; SL-Sal=147,05±4,95; SL-Ins=67,37±3,25; ANOVA de duas vias, droga: F(1,33)=107,72; p<0.001; grupo F(1,33)=2,538; p=0,122; interação F(1,33)=0,186; p=0,67).

6.4 Testes de consumo alimentar

6.4.1 Consumo basal

Em relação ao consumo de ração padrão, houve um maior consumo no grupo SL, porém não atingindo significância estatística, (NL=24,47±0,48g/24h, SL=25,74±0,48g/24h; Student T-test, t=1.843 p=0,084, NL n=8, SL n=10).

6.4.2 Resposta ao isolamento e ao jejum

O isolamento social não levou a respostas diferentes no consumo alimentar (Teste T de Student. $T=1,34$; $p=0,186$; NL $n=27$, SL $n=28$). Comparando-se o consumo na caixa moradia com os ratos em grupos de 2-4 animais (consumo basal descrito acima), através da realização da média do consumo individual em isolamento dos animais que compunham o grupo da caixa original, tem-se que o isolamento não reduziu significativamente o consumo (ANOVA de medidas repetidas, isolamento $p=0,085$, e interação isolamento x grupo $p=0,993$; NL $n=8$, SL $n=10$). Já o jejum, usando a mesma metodologia acima, levou à hiperfagia em ambos os grupos (ANOVA de medidas repetidas, jejum $p<0,001$, e interação jejum x grupo $p=0,364$; NL $n=8$, SL $n=10$) (Figuras 6 a-b).

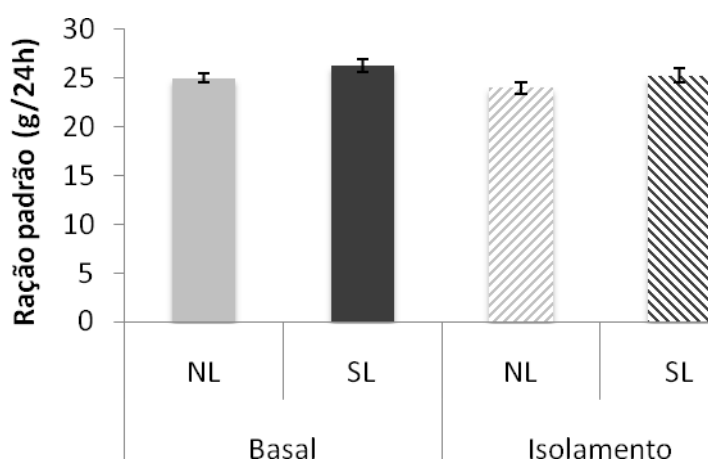


Figura 6a: Resposta de consumo de ração padrão ao isolamento social

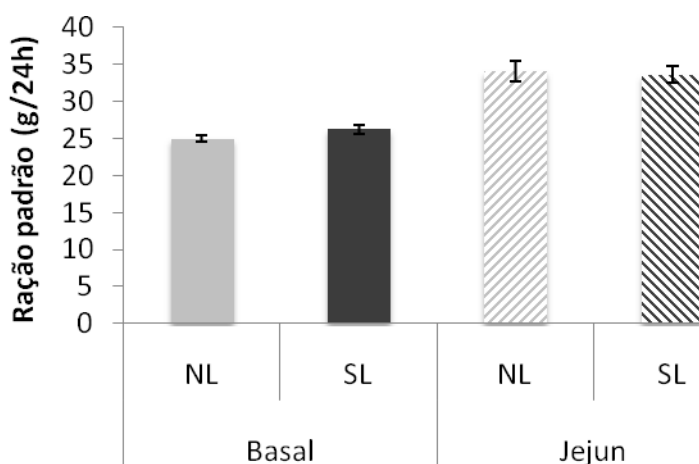


Figura 6b: Resposta de consumo de ração padrão a um jejum de 24h

6.4.3 Alimento doce: basal, preferência e teste de *tail-pinch*

O teste de consumo de alimento doce realizado logo após a habituação não mostrou diferença no consumo entre os grupos NL e SL (NL=1,25±0,32; SL=1,48±0,39; Teste T de Student; t=0,453 p=0,652; NL n=26, SL n=28). No entanto, quando testados para preferência entre o doce e a ração padrão, os ratos SL apresentarem maior consumo do alimento doce (Teste T de Student, t=2,481 p=0,017 NL n=25, SL n=25), não diferindo no consumo de ração padrão (Teste T de Student, t=0,248 p=0,805 NL n=25, SL n=25). Figura 7

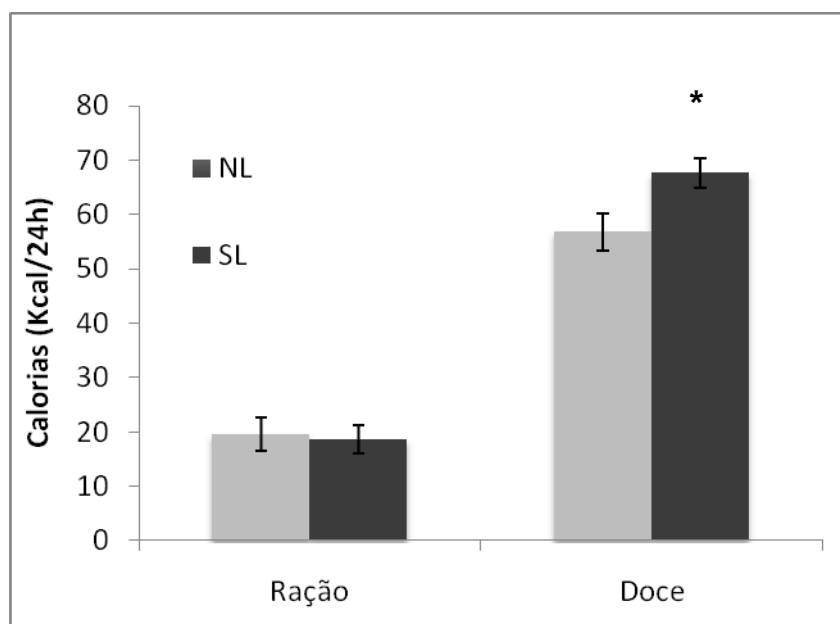


Figura 7: Teste de preferência alimentar entre ração padrão e alimento doce na caixa-moradia(Froot Loops®, Kellogs).

Consumo em calorias / 24h.

Quanto ao consumo de Froot loops em 1h após 1 min. de estresse de *tail-pinch*, uma ANOVA de duas vias (grupo X *tail-pinch*), mostrou ausência de efeito de grupo ($F(1,32)=0,566$, $p=0,457$), e ausência de efeito do *tail-pinch* ($F(1,32)=0,035$, $p=0,85$), porém uma interação significativa ($F(1,32)=19,317$; $p=0,006$), demonstrando que animais SL apresentam uma resposta diferente dos NL em resposta ao *tail-pinch*, ingerindo mais alimento doce. Figura 8.

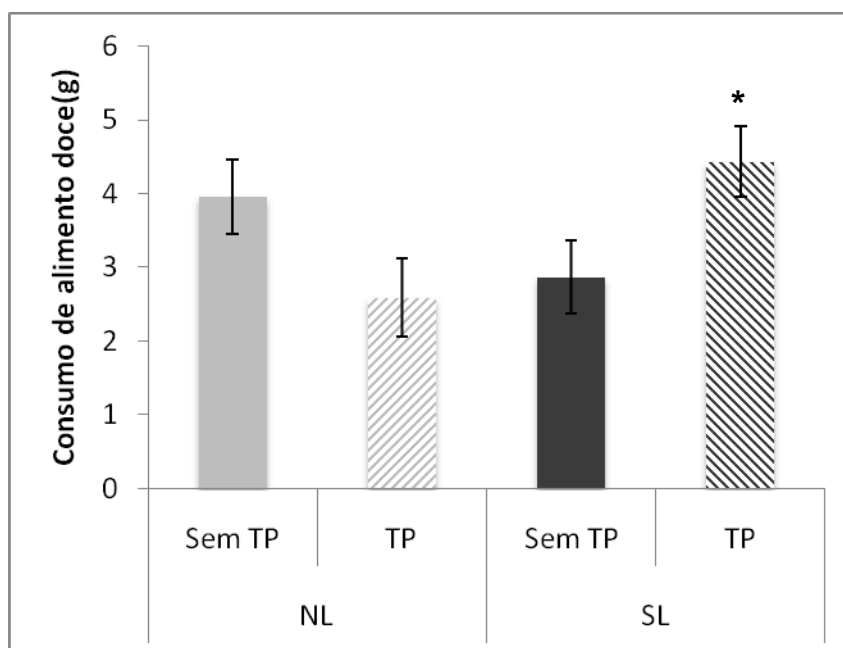


Figura 8: Consumo de alimento doce em 1h, após realização de estresse de *tail-pinch* (pinçamento da cauda) de 1min.

6.5 Conteúdo de Tirosina Hidroxilase (TH) em núcleos do sistema mesolímbico.

A figura 9 mostra os resultados de TH nos núcleos VTA e Acc do sistema mesolímbico. No VTA, foi observado em ratos SL um valor médio quase 2,5 vezes maior de TH quando comparados com ratos NL (Teste T de Student, $t=2.85$ $p=0.016$; SL $n=7$, NL $n=6$). No núcleo accumbens, também observou-se um aumento de TH nos mesmos ratos, porém de menor intensidade (Teste T de Student, $t=2.62$ $p=0.022$, $n=7$).

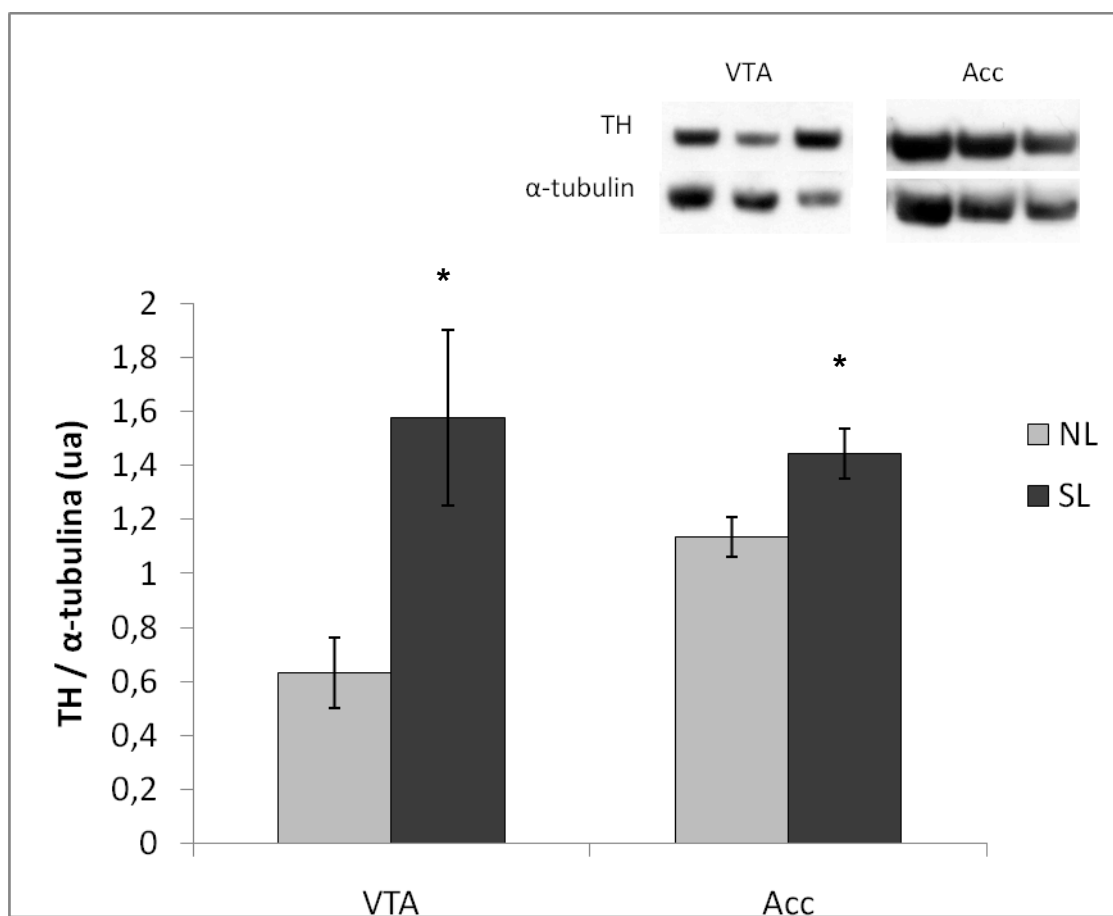


Figura 9: Conteúdo de TH nos núcleos VTA e Acc do sistema mesolímbico.

7. DISCUSÃO

O presente estudo visou estabelecer o fenótipo de um modelo de obesidade precoce no que se refere ao comportamento alimentar, principalmente ao seu componente hedônico. Vimos então que os animais com obesidade precoce apresentaram um aumento da preferência por alimento doce na vida adulta, e maior consumo de doce quando desafiados numa situação de estresse leve e breve. Ao mesmo tempo, comportam-se semelhantemente aos ratos controle no consumo basal de ração habitual e na resposta alimentar à deprivação social e ao jejum. Ao que parece, a regulação da alimentação não hedônica esteve preservada, ao passo que o componente hedônico encontrou-se alterado nesses animais.

Os animais SL também apresentaram um comportamento exploratório no teste de locomoção compatível com redução da ansiedade, o que já foi mostrado anteriormente por Spencer *et al.* Esses autores encontraram, num modelo de superalimentação neonatal semelhante ao utilizado aqui, que os animais SL apresentavam menor ansiedade em testes comportamentais (Campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado), e também maior ativação de áreas do Sistema Nervoso Central (SNC) relacionadas ao estresse (Núcleo paraventricular do hipotálamo - PVN e Núcleo paraventricular do Tálamo - PVT). No entanto, estes pesquisadores não encontraram diferente resposta de glicocorticóides no teste de resposta ao estresse de imobilização em animais SL quando comparados aos NL (Spencer e Tilbrook, 2009). Outro grupo, todavia, identificou que a superalimentação neonatal aumentou os níveis basais e reacionais de glicocorticóides, com maior expressão de seus receptores tipo GR no tecido adiposo (Boullu-Ciocca, Dutour *et al.*, 2005).

Os achados também evidenciaram um elevado conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) em dois importante núcleos do sistema mesolímbico relacionados com a alimentação hedônica, a área ventral-tegmentar (VTA), e o núcleo accumbens (Acc) de ratos superalimentados no período de lactação. A TH é a enzima limitante da produção de dopamina, que age catalisando a conversão do aminoácido tirosina a DOPA, que é um precursor da dopamina (Masserano e Weiner, 1983). Uma grande base de literatura hoje em dia permite apontar a dopamina do sistema mesolímbico como participante ativa dos processos de alimentação, especialmente quando

envolvendo algum aspecto hedônico ou motivacional (Wise, 2006; Salamone, Correa *et al.*, 2007; Berridge, 2009). A liberação endógena de dopamina no núcleo Accumbens em resposta a estresse leve, como o de *tail-pinch*, induz a procura e a ingestão de alimentos (Samarghandian, Ohata *et al.*, 2003), tanto quanto a injeção direta do mesmo neurotransmissor (Pal e Thombre, 1993; Swanson, Heath *et al.*, 1997).

Tanto estudos clínicos quanto estudos experimentais com animais de laboratório apontam para uma menor atividade da dopamina no núcleo Accumbens em obesos. Wang e co-autores, utilizando tomografia por emissão de positrons (PET-Scan), descreveram menor disponibilidade de receptores de dopamina D2 no núcleo estriado destes indivíduos, sugerindo duas possibilidades para esse fenômeno: (1) redução adaptativa (*down regulation*) dos receptores para compensar um estado de aumento crônico da liberação de dopamina pela superalimentação, ou (2) superalimentação para compensar uma menor ativação dos mecanismos de recompensa e prazer (Wang, Volkow *et al.*, 2001). Utilizando-se de técnicas de imagem, Stice *et al.*, identificaram que mulheres adolescentes obesas teriam menor ativação do núcleo estriado ao ingerir um alimento palatável (Stice, Spoor *et al.*, 2008).

Coerentemente com os achados acima expostos, estudos em modelos animais mostraram também alterações dopaminérgicas em relação a obesidade, superalimentação e prazer. Li *et al.* mostraram que uma exposição de 6 semanas à superalimentação com dieta rica em gordura estaria associada a uma redução da TH no VTA, VMH, e Substância Nigra (Li, South *et al.*, 2009). Estudando os efeitos após 15 semanas de dieta de cafeteria (mistura de vários alimentos palatáveis, ricos em gordura e açúcar), Geiger e co-autores também encontraram uma menor atividade dopaminérgica mesolímbica basal, avaliada tanto por microdiálise *in-vivo*, quanto por estimulação elétrica *ex- vivo* (Geiger, Haburcak *et al.*, 2009). Esse estado "hipodopaminérgico" também foi confirmado por um achado de menor *turnover* da dopamina em ratos superalimentados com ração rica em gordura na vida adulta (Davis, Tracy *et al.*, 2008).

A ingestão de alimento palatável não é a única estimulação que ativa a liberação de dopamina no SNC, pois a distensão gástrica também é capaz de ativá-la. Sobre este assunto, Tomasi *et al.*, utilizando ressonância magnética funcional,

encontrou uma correlação negativa entre IMC e a ativação de áreas dopaminérgicas como a amígdala, mesencéfalo, hipotálamo e tálamo em resposta à distensão gástrica induzida por alimentos (Tomasi, Wang *et al.*, 2009).

No contexto da obesidade estar associada à hipofunção dopaminérgica, o achado deste trabalho é intrigante. Esperaria-se mais facilmente uma menor quantidade de TH no VTA e Acc, com mostrado por Li *et al* num protocolo de superalimentação na vida adulta (Li, South *et al.*, 2009), mas encontrou-se o oposto. Ainda, a magnitude do efeito no VTA realmente chama a atenção: 2,5 vezes maior que o controle. Aqui cabe ressaltar que uma quantidade maior de TH não necessariamente traduz-se em maior atividade dopaminérgica, pois o maior TH/mais produção de dopamina podem ocorrer justamente como uma compensação por menor presença de receptores de dopamina na região (Wang, Volkow *et al.*, 2001; Brake, Zhang *et al.*, 2004). Congruente com isso, são os achados de Silveira *et al.* Ao investigar o papel da função dopaminérgica em ratos manipulados no período neonatal (paradigma de intervenção precoce associado também a maior preferência por alimentos palatáveis na vida adulta), estes autores descrevem maior quantidade de dopamina total no núcleo Accumbens, medida por HPLC, porém com menor quantidade de seus metabólitos. Isto explicita uma menor atividade dopaminérgica nesses animais (Silveira, Portella *et al.*, 2010).

Há semelhanças interessantes entre os modelos de manipulação neonatal e de superalimentação precoce. Os animais brevemente manipulados na vida precoce apresentam achados muito parecidos de redução da ansiedade (Silveira, Portella *et al.*, 2004; Silveira, Portella *et al.*, 2005), aumento do consumo de alimento doce (Silveira, Portella *et al.*, 2004; Silveira, Da Silva Benetti *et al.*, 2006) e alterações do sistema dopaminérgico mesolímbico, com maior quantidade de dopamina no núcleo Accumbens, porém com menor *turnover*, (Silveira, Portella *et al.*, 2010). No entanto, animais dos dois modelos diferem significativamente quanto à reatividade ao estresse na vida adulta (Boullu-Ciocca, Dutour *et al.*, 2005; Spencer e Tilbrook, 2009). Animais manipulados no período neonatal classicamente respondem menos ao estresse na vida adulta, enquanto animais superalimentados respondem mais. Isto sugere que o efeito de aumento de consumo de doce potencialmente está mais associado à alteração dopaminérgica do que à resposta ao estresse. No entanto, é possível que a reatividade ao estresse module o risco à obesidade, o qual é reduzido em animais manipulados na

vida neonatal (Benetti, Silveira *et al.*, 2006; Benetti, Silveira *et al.*, 2007) e também em animais criados por mães com maior cuidado materno (Silveira, Portella *et al.*, 2006), mecanismo pelo qual aventa-se que a manipulação neonatal induza seus efeitos (Smythe, Rowe *et al.*, 1994; Liu, Diorio *et al.*, 1997).

Outros achados referentes à validação do modelo de superalimentação neonatal por redução da ninhada como um modelo de indução de obesidade são o ganho de peso precoce e alteração da composição corporal, com maior acúmulo de gordura abdominal aos quatro/cinco meses de vida. Todavia, apesar de obesos, os ratos SL não apresentaram resistência à insulina no teste de desafio com insulina, o que não é de se surpreender uma vez que nem sempre estas situações (obesidade e resistência à insulina) são vistas em conjunto (Abbasi, Brown *et al.*, 2002; Reaven, 2005).

A redução dos níveis plasmáticos de glicose em resposta à insulina foi semelhante entre os grupos. Apenas os níveis de AKT total muscular foram reduzidos nos animais SL, o que pode sinalizar uma resistência latente - ativação de mecanismos compensatórios visando manter a ação fisiológica do hormônio - à insulina nestes animais. Essa proteína é proposta como um intermediário da cascata de sinalização intracelular da insulina, através da qual ocorreria a captação da glicose plasmática (Hajduch, Litherland *et al.*, 2001). Um nível aumentado de AKT total muscular está associado a um maior nível de sensibilidade à insulina em alguns trabalhos, por facilitar a translocação de GLUT4 e síntese de glicogênio (Kohn, Summers *et al.*, 1996; Ueki, Yamamoto-Honda *et al.*, 1998), sendo, por exemplo um dos mecanismos de ação propostos do medicamento hipoglicemiante troglitazone (Planavila, Alegret *et al.*, 2005).

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo mostrou que o ambiente precoce impactou de maneira importante as condições de saúde dos animais adultos.

Em relação aos objetivos:

- O comportamento alimentar não hedônico não esteve alterado em nenhuma das situações avaliadas.
- O comportamento alimentar hedônico mostrou-se alterado em situações envolvendo escolha entre o alimento doce e o alimento padrão, e também quando estimulado pelo teste de pinçamento de cauda.
- Encontraram-se alterações centrais do metabolismo da dopamina em núcleos chave relacionados ao controle do comportamento alimentar, o núcleo Accumbens e a Área Tegmentar Ventral.

Considerando uma possível translação para humanos desses achados em animais, pode-se sugerir que práticas inadequadas de alimentação na vida precoce afetam de forma persistente o comportamento alimentar do indivíduo, o que o coloca sob maior risco de desenvolver obesidade.

Levando em conta o contexto atual de elevada prevalência de obesidade e de farta disponibilidade de alimentos palatáveis, é de grande valia o conhecimento de que o risco do desenvolvimento de doenças associadas está relacionado a experiências no início da vida. O reconhecimento dessa vulnerabilidade precoce, assim como dos potenciais mecanismos envolvidos, pode determinar novas abordagens e facilitar a prevenção de doenças.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBASI, F.; BROWN, B. W., JR.; LAMENDOLA, C.; MCLAUGHLIN, T.; REAVEN, G. M. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol*, v. 40, n. 5, p. 937-43, 2002.
2. ABIZAID, A.; LIU, Z. W.; ANDREWS, Z. B.; SHANABROUGH, M.; BOROK, E.; ELSWORTH, J. D.; ROTH, R. H.; SLEEMAN, M. W.; PICCIOTTO, M. R.; TSCHOP, M. H.; GAO, X. B.; HORVATH, T. L. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest*, v. 116, n. 12, p. 3229-39, 2006.
3. BALDWIN, A. E.; SADEGHIAN, K.; KELLEY, A. E. Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, v. 22, n. 3, p. 1063-71, 2002.
4. BARBIERI, M. A.; PORTELLA, A. K.; SILVEIRA, P. P.; BETTIOL, H.; AGRANONIK, M.; SILVA, A. A.; GOLDANI, M. Z. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res*, v. 65, n. 2, p. 215-20, 2009.
5. BARKER, D. J. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, v. 95, n. 2, p. 115-28, 1998.
6. BASKIN, D. G.; BREININGER, J. F.; SCHWARTZ, M. W. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, v. 48, n. 4, p. 828-33, 1999.
7. BASKIN, D. G.; HAHN, T. M.; SCHWARTZ, M. W. Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res*, v. 31, n. 5, p. 345-50, 1999.
8. BENETTI, C.; SILVEIRA, P.; PORTELLA, A.; AYRES, C.; MATTE, C.; STEFANELLO, F.; WISE, A.; DALMAZ, C.; GOLDANI, M. Chronic palatable hypercaloric diet in adulthood of neonatally handled rats and risk factors for later cardiovascular disease. *EARLY HUMAN DEVELOPMENT*, v. 82, n. 8, p. 517-517, 2006.
9. BENETTI, C.; SILVEIRA, P.; PORTELLA, A.; DIEHL, L.; NUNES, E.; DE OLIVEIRA, V.; DALMAZ, C.; GOLDANI, M. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *PEDIATRIC RESEARCH*, v. 62, n. 4, p. 405-411, 2007.
10. BENOIT, S.; SCHWARTZ, M.; BASKIN, D.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. *Horm Behav*, v. 37, n. 4, p. 299-305, 2000.

11. BERGMANN, K. E.; BERGMANN, R. L.; VON KRIES, R.; BOHM, O.; RICHTER, R.; DUDENHAUSEN, J. W.; WAHN, U. Early determinants of childhood overweight and adiposity in a birth cohort study: role of breast-feeding. *International Journal of Obesity*, v. 27, n. 2, p. 162-172, 2003.
12. BERRIDGE, K. C. Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety, and sensory-specific satiety in the rat. *Appetite*, v. 16, n. 2, p. 103-20, 1991.
13. BERRIDGE, K. C. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav*, v. 97, n. 5, p. 537-50, 2009.
14. BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev*, v. 28, n. 3, p. 309-69, 1998.
15. BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 26, n. 4, p. 393-428, 2002.
16. BERTHOUD, H. R. Neural control of appetite: cross-talk between homeostatic and non-homeostatic systems. *Appetite*, v. 43, n. 3, p. 315-7, 2004.
17. BETTIOL, H.; SABBAG FILHO, D.; HAEFFNER, L. S.; BARBIERI, M. A.; SILVA, A. A.; PORTELA, A.; SILVEIRA, P.; GOLDANI, M. Z. Do intrauterine growth restriction and overweight at primary school age increase the risk of elevated body mass index in young adults? *Braz J Med Biol Res*, v. 40, n. 9, p. 1237-43, 2007.
18. BITTENCOURT, J. C.; PRESSE, F.; ARIAS, C.; PETO, C.; VAUGHAN, J.; NAHON, J. L.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, v. 319, n. 2, p. 218-45, 1992.
19. BLUNDELL, J. E.; FINLAYSON, G. Is susceptibility to weight gain characterized by homeostatic or hedonic risk factors for overconsumption? *Physiol Behav*, v. 82, n. 1, p. 21-5, 2004.
20. BOULLU-CIOCCA, S.; DUTOUR, A.; GUILLAUME, V.; ACHARD, V.; OLIVER, C.; GRINO, M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes*, v. 54, n. 1, p. 197-203, 2005.
21. BRAKE, W. G.; ZHANG, T. Y.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J.; GRATTON, A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci*, v. 19, n. 7, p. 1863-74, 2004.
22. CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, v. 348, n. 17, p. 1625-38, 2003.

23. CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*, v. 67, p. 259-84, 2005.
24. CHEN, C. T.; DUN, S. L.; KWOK, E. H.; DUN, N. J.; CHANG, J. K. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett*, v. 260, n. 3, p. 161-4, 1999.
25. CLARK, J. T.; KALRA, P. S.; CROWLEY, W. R.; KALRA, S. P. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*, v. 115, n. 1, p. 427-9, 1984.
26. CLIFTON, P. G.; VICKERS, S. P.; SOMERVILLE, E. M. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behav Neurosci*, v. 112, n. 3, p. 502-11, 1998.
27. CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*, v. 8, n. 5, p. 571-8, 2005.
28. CONE, R. D.; COWLEY, M. A.; BUTLER, A. A.; FAN, W.; MARKS, D. L.; LOW, M. J. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 25 Suppl 5, p. S63-7, 2001.
29. CORBIT, L. H.; MUIR, J. L.; BALLEINE, B. W. The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci*, v. 21, n. 9, p. 3251-60, 2001.
30. COTA, D.; MARSICANO, G.; TSCHOP, M.; GRUBLER, Y.; FLACHSKAMM, C.; SCHUBERT, M.; AUER, D.; YASSOURIDIS, A.; THONE-REINEKE, C.; ORTMANN, S.; TOMASSONI, F.; CERVINO, C.; NISOLI, E.; LINTHORST, A. C.; PASQUALI, R.; LUTZ, B.; STALLA, G. K.; PAGOTTO, U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, v. 112, n. 3, p. 423-31, 2003.
31. DABELEA, D.; HANSON, R. L.; LINDSAY, R. S.; PETTITT, D. J.; IMPERATORE, G.; GABIR, M. M.; ROUMAIN, J.; BENNETT, P. H.; KNOWLER, W. C. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes*, v. 49, n. 12, p. 2208-11, 2000.
32. DANIELZIK, S.; LANGNASE, K.; MAST, M.; SPETHMANN, C.; MULLER, M. J. Impact of parental BMI on the manifestation of overweight 5-7 year old children. *Eur J Nutr*, v. 41, n. 3, p. 132-8, 2002.
33. DAVIS, A.; LIPSETT, M.; MILET, M.; ETHEERTON, M.; KREUTZER, R. An association between asthma and BMI in adolescents: results from the California Healthy Kids Survey. *J Asthma*, v. 44, n. 10, p. 873-9, 2007.

34. DAVIS, J. F.; TRACY, A. L.; SCHURDAK, J. D.; TSCHOP, M. H.; LIPTON, J. W.; CLEGG, D. J.; BENOIT, S. C. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behav Neurosci*, v. 122, n. 6, p. 1257-63, 2008.
35. DEFALCO, J.; TOMISHIMA, M.; LIU, H.; ZHAO, C.; CAI, X.; MARTH, J. D.; ENQUIST, L.; FRIEDMAN, J. M. Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science*, v. 291, n. 5513, p. 2608-13, 2001.
36. DEIERLEIN, A. L.; SIEGA-RIZ, A. M.; ADAIR, L. S.; HERRING, A. H. Effects of Pre-Pregnancy Body Mass Index and Gestational Weight Gain on Infant Anthropometric Outcomes. *J Pediatr*, 2010.
37. DIETZ, W. H.; BELLIZZI, M. C. Introduction: the use of body mass index to assess obesity in children. *Am J Clin Nutr*, v. 70, n. 1, p. 123S-5S, 1999.
38. DORNER, G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta Biol Med Ger*, v. 34, n. 6, p. 1093-5, 1975.
39. DÖRNER, G. Perinatal hormone levels and brain organization. In: STUMPF, W. E. A. G., L.D. EDITORS (Ed.). **Anatomical neuroendocrinology**. Basel: Karger, 1974.
40. DORNER, G.; PLAGEMANN, A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res*, v. 26, n. 5, p. 213-21, 1994.
41. EL-SERAG, H. B.; ERGUN, G. A.; PANDOLFINO, J.; FITZGERALD, S.; TRAN, T.; KRAMER, J. R. Obesity increases oesophageal acid exposure. *Gut*, v. 56, n. 6, p. 749-55, 2007.
42. ELLACOTT, K. L.; CONE, R. D. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog Horm Res*, v. 59, p. 395-408, 2004.
43. FERNANDEZ, C. M.; MOLTO, E.; GALLARDO, N.; DEL ARCO, A.; MARTINEZ, C.; ANDRES, A.; ROS, M.; CARRASCOSA, J. M.; ARRIBAS, C. The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. *Metabolism*, v. 58, n. 2, p. 204-11, 2009.
44. FIGLEWICZ, D. P.; MACDONALD NALEID, A.; SIPOLS, A. J. Modulation of food reward by adiposity signals. *Physiol Behav*, v. 91, n. 5, p. 473-8, 2007.
45. FLEGAL, K. Epidemiologic aspects of overweight and obesity in the United States. *Physiol Behav*, v. 86, n. 5, p. 599-602, 2005.

46. FLEGAL, K.; CARROLL, M.; KUCZMARSKI, R.; JOHNSON, C. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 22, n. 1, p. 39-47, 1998.
47. FLEGAL, K. M.; TABAK, C. J.; OGDEN, C. L. Overweight in children: definitions and interpretation. *Health Educ Res*, v. 21, n. 6, p. 755-60, 2006.
48. FREEDMAN, D. S.; KHAN, L. K.; DIETZ, W. H.; SRINIVASAN, S. R.; BERENSON, G. S. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: The Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*, v. 108, n. 3, p. 712-718, 2001.
49. GEIGER, B. M.; HABURCAK, M.; AVENA, N. M.; MOYER, M. C.; HOEBEL, B. G.; POTHOS, E. N. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*, v. 159, n. 4, p. 1193-9, 2009.
50. GIRAUDO, S. Q.; KOTZ, C. M.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, A. S. Association between the amygdala and nucleus of the solitary tract in mu-opioid induced feeding in the rat. *Brain Res*, v. 802, n. 1-2, p. 184-8, 1998.
51. GLAUM, S. R.; HARA, M.; BINDOKAS, V. P.; LEE, C. C.; POLONSKY, K. S.; BELL, G. I.; MILLER, R. J. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol Pharmacol*, v. 50, n. 2, p. 230-5, 1996.
52. GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 25 Suppl 5, p. S73-7, 2001.
53. GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front Neuroendocrinol*, v. 23, n. 1, p. 2-40, 2002.
54. GRILL, H. J.; MARKISON, S.; GINSBERG, A.; KAPLAN, J. M. Long-term effects on feeding and body weight after stimulation of forebrain or hindbrain CRH receptors with urocortin. *Brain Res*, v. 867, n. 1-2, p. 19-28, 2000.
55. GUAN, J. L.; OKUDA, H.; TAKENOYA, F.; KINTAKA, Y.; YAGI, M.; WANG, L.; SEKI, M.; HORI, Y.; KAGEYAMA, H.; SHIODA, S. Synaptic relationships between proopiomelanocortin- and ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Regul Pept*, v. 145, n. 1-3, p. 128-32, 2008.
56. GUAN, J. L.; SAOTOME, T.; WANG, Q. P.; FUNAHASHI, H.; HORI, T.; TANAKA, S.; SHIODA, S. Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport*, v. 12, n. 3, p. 547-51, 2001.
57. GUILLAUME, M. Defining obesity in childhood: current practice. *Am J Clin Nutr*, v. 70, n. 1, p. 126S-30S, 1999.

58. GUO, S. S.; ROCHE, A. F.; CHUMLEA, W. C.; GARDNER, J. D.; SIERVOGEL, R. M. The predictive value of childhood body mass index values for overweight at age 35 y. *Am J Clin Nutr*, v. 59, n. 4, p. 810-9, 1994.
59. HAJDUCH, E.; LITHERLAND, G. J.; HUNDAL, H. S. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett*, v. 492, n. 3, p. 199-203, 2001.
60. HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v. 35, n. 7, p. 595-601, 1992.
61. HALL, W. G. Weaning and growth of artificially reared rats. *Science*, v. 190, n. 4221, p. 1313-5, 1975.
62. HARDER, T.; BERGMANN, R.; KALLISCHNIGG, G.; PLAGEMANN, A. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am J Epidemiol*, v. 162, n. 5, p. 397-403, 2005.
63. HELLSTROM, P. M.; GELIEBTER, A.; NASLUND, E.; SCHMIDT, P. T.; YAHAV, E. K.; HASHIM, S. A.; YEOMANS, M. R. Peripheral and central signals in the control of eating in normal, obese and binge-eating human subjects. *Br J Nutr*, v. 92 Suppl 1, p. S47-57, 2004.
64. HENTGES, S. T.; NISHIYAMA, M.; OVERSTREET, L. S.; STENZEL-POORE, M.; WILLIAMS, J. T.; LOW, M. J. GABA release from proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci*, v. 24, n. 7, p. 1578-83, 2004.
65. HIMES, J. H.; DIETZ, W. H. Guidelines for overweight in adolescent preventive services: recommendations from an expert committee. The Expert Committee on Clinical Guidelines for Overweight in Adolescent Preventive Services. *Am J Clin Nutr*, v. 59, n. 2, p. 307-16, 1994.
66. HORVATH, T. L.; DIANO, S.; VAN DEN POL, A. N. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci*, v. 19, n. 3, p. 1072-87, 1999.
67. JANSEN, A. S.; HOFFMAN, J. L.; LOEWY, A. D. CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res*, v. 766, n. 1-2, p. 29-38, 1997.
68. JERLHAG, E.; EGECIOGLU, E.; DICKSON, S. L.; ANDERSSON, M.; SVENSSON, L.; ENGEL, J. A. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol*, v. 11, n. 1, p. 45-54, 2006.

69. KALRA, S. P.; DUBE, M. G.; PU, S.; XU, B.; HORVATH, T. L.; KALRA, P. S. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, v. 20, n. 1, p. 68-100, 1999.
70. KAMEGAI, J.; HASEGAWA, O.; MINAMI, S.; SUGIHARA, H.; WAKABAYASHI, I. The growth hormone-releasing peptide KP-102 induces c-fos expression in the arcuate nucleus. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 39, n. 1-2, p. 153-9, 1996.
71. KAMEGAI, J.; TAMURA, H.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; SUGIHARA, H.; WAKABAYASHI, I. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology*, v. 141, n. 12, p. 4797-800, 2000.
72. KIM, J.; PETERSON, K. E.; SCANLON, K. S.; FITZMAURICE, G. M.; MUST, A.; OKEN, E.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; RICH-EDWARDS, J. W.; GILLMAN, M. W. Trends in overweight from 1980 through 2001 among preschool-aged children enrolled in a health maintenance organization. *Obesity (Silver Spring)*, v. 14, n. 7, p. 1107-12, 2006.
73. KOCH, J. E.; MATTHEWS, S. M. Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in Lewis rats: effects of peripheral and central administration. *Nutr Neurosci*, v. 4, n. 3, p. 179-87, 2001.
74. KOHN, A. D.; SUMMERS, S. A.; BIRNBAUM, M. J.; ROTH, R. A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*, v. 271, n. 49, p. 31372-8, 1996.
75. KOPLAN, J. P.; LIVERMAN, C. T.; KRAAK, V. I. Preventing childhood obesity: health in the balance: executive summary. *J Am Diet Assoc*, v. 105, n. 1, p. 131-8, 2005.
76. KREBS, N. F.; HIMES, J. H.; JACOBSON, D.; NICKLAS, T. A.; GUILDAY, P.; STYNE, D. Assessment of child and adolescent overweight and obesity. *Pediatrics*, v. 120 Suppl 4, p. S193-228, 2007.
77. LI, C.; CHEN, P.; SMITH, M. S. Identification of neuronal input to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implications in the activation of neuropeptide Y neurons. *Brain Res*, v. 824, n. 2, p. 267-76, 1999.
78. LI, Y.; SOUTH, T.; HAN, M.; CHEN, J.; WANG, R.; HUANG, X. F. High-fat diet decreases tyrosine hydroxylase mRNA expression irrespective of obesity susceptibility in mice. *Brain Res*, v. 1268, p. 181-9, 2009.
79. LIN, L.; YORK, D. A. Amygdala enterostatin induces c-Fos expression in regions of hypothalamus that innervate the PVN. *Brain Res*, v. 1020, n. 1-2, p. 147-53, 2004.

80. LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, v. 277, n. 5332, p. 1659-62, 1997.
81. LOPEZ, M.; TOVAR, S.; VAZQUEZ, M. J.; NOGUEIRAS, R.; SEOANE, L. M.; GARCIA, M.; SENARIS, R. M.; DIEGUEZ, C. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *Int J Obes (Lond)*, v. 31, n. 2, p. 371-7, 2007.
82. LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*, v. 156, p. 38-50; discussion 50-5, 1991.
83. LUCAS, A.; BROOKE, O. G.; MORLEY, R.; COLE, T. J.; BAMFORD, M. F. Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. *BMJ*, v. 300, n. 6728, p. 837-40, 1990.
84. LUCAS, A.; MORLEY, R.; COLE, T. J. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *BMJ*, v. 317, n. 7171, p. 1481-7, 1998.
85. LUSSANA, F.; PAINTER, R. C.; OCKE, M. C.; BULLER, H. R.; BOSSUYT, P. M.; ROSEBOOM, T. J. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr*, v. 88, n. 6, p. 1648-52, 2008.
86. MAGAREY, A. M.; DANIELS, L. A.; BOULTON, T. J.; COCKINGTON, R. A. Predicting obesity in early adulthood from childhood and parental obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 27, n. 4, p. 505-13, 2003.
87. MANDIC, Z.; PIRICKI, A. P.; KENJERIC, D.; HANICAR, B.; TANASIC, I. Breast vs. bottle: differences in the growth of Croatian infants. *Matern Child Nutr*, 2010.
88. MASSERANO, J. M.; WEINER, N. Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system. *Mol Cell Biochem*, v. 53-54, n. 1-2, p. 129-52, 1983.
89. MCCANCE, D. R.; PETTITT, D. J.; HANSON, R. L.; JACOBSSON, L. T.; KNOWLER, W. C.; BENNETT, P. H. Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ*, v. 308, n. 6934, p. 942-5, 1994.
90. MCCANCE, R. A. Food, growth, and time. *Lancet*, v. 2, n. 7258, p. 671-6, 1962.
91. MCGEE, D. L. Body mass index and mortality: a meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies. *Ann Epidemiol*, v. 15, n. 2, p. 87-97, 2005.

92. MELA, D. J. Eating for pleasure or just wanting to eat? Reconsidering sensory hedonic responses as a driver of obesity. *Appetite*, v. 47, n. 1, p. 10-7, 2006.
93. MERCER, J. G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L. M.; LAWRENCE, C. B.; HANNAH, L. T.; TRAYHURN, P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*, v. 387, n. 2-3, p. 113-6, 1996.
94. MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; POPKIN, B. M. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. *Am J Public Health*, v. 97, n. 10, p. 1808-12, 2007.
95. MUHLHAUSLER, B. S.; ADAM, C. L.; FINDLAY, P. A.; DUFFIELD, J. A.; MCMILLEN, I. C. Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain (vol 20, pg 1257, 2006). *Faseb Journal*, v. 21, n. 2, p. 629-629, 2007.
96. MUROYA, S.; YADA, T.; SHIODA, S.; TAKIGAWA, M. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci Lett*, v. 264, n. 1-3, p. 113-6, 1999.
97. MUST, A.; JACQUES, P. F.; DALLAL, G. E.; BAJEMA, C. J.; DIETZ, W. H. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. *N Engl J Med*, v. 327, n. 19, p. 1350-5, 1992.
98. NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*, v. 14, p. 353-62, 1962.
99. NEOVIUS, M.; LINNE, Y.; BARKELING, B.; ROSSNER, S. Discrepancies between classification systems of childhood obesity. *Obes Rev*, v. 5, n. 2, p. 105-14, 2004.
100. OGDEN, C.; CARROLL, M.; CURTIN, L.; LAMB, M.; FLEGAL, K. Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008. *JAMA*, v. 303, n. 3, p. 242-9, 2010.
101. OGDEN, C. L.; FLEGAL, K. M. Changes in terminology for childhood overweight and obesity. *Natl Health Stat Report*, n. 25, p. 1-5, 2010.
102. PAL, G. K.; THOMBRE, D. P. Modulation of feeding and drinking by dopamine in caudate and accumbens nuclei in rats. *Indian J Exp Biol*, v. 31, n. 9, p. 750-4, 1993.
103. PETTITT, D. J.; JOVANOVIC, L. Birth weight as a predictor of type 2 diabetes mellitus: the U-shaped curve. *Curr Diab Rep*, v. 1, n. 1, p. 78-81, 2001.

104. PLAGEMANN, A. A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation. *J Matern Fetal Neonatal Med*, v. 21, n. 3, p. 143-8, 2008.
105. PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; BRUNN, M.; HARDER, A.; ROEPKE, K.; WITTRÖCK-STAAAR, M.; ZISKA, T.; SCHELLONG, K.; RODEKAMP, E.; MELCHIOR, K.; DUDENHAUSEN, J. W. Hypothalamic POMC promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol*, 2009.
106. PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; DUDENHAUSEN, J. W. The diabetic pregnancy, macrosomia, and perinatal nutritional programming. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, v. 61, p. 91-102, 2008.
107. PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; MELCHIOR, K.; RAKE, A.; ROHDE, W.; DORNER, G. Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats. *Neuroreport*, v. 10, n. 15, p. 3211-6, 1999.
108. PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; MELCHIOR, K.; RITTEL, F.; ROHDE, W.; DORNER, G. Hypothalamic insulin and neuropeptide Y in the offspring of gestational diabetic mother rats. *Neuroreport*, v. 9, n. 18, p. 4069-73, 1998.
109. PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; VOITS, M.; FINK, H.; ROHDE, W.; DORNER, G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res*, v. 836, n. 1-2, p. 146-55, 1999.
110. PLAGEMANN, A.; HEIDRICH, I.; GOTZ, F.; ROHDE, W.; DORNER, G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol*, v. 99, n. 3, p. 154-8, 1992.
111. PLANAVILA, A.; ALEGRET, M.; SANCHEZ, R. M.; RODRIGUEZ-CALVO, R.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ-CARRERA, M. Increased Akt protein expression is associated with decreased ceramide content in skeletal muscle of troglitazone-treated mice. *Biochem Pharmacol*, v. 69, n. 8, p. 1195-204, 2005.
112. PRADHAN, A. D.; RIFAI, N.; RIDKER, P. M. Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation*, v. 106, n. 7, p. 820-5, 2002.
113. RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, v. 295, n. 7, p. 349-53, 1976.

114. REAVEN, G. All obese individuals are not created equal: insulin resistance is the major determinant of cardiovascular disease in overweight/obese individuals. *Diab Vasc Dis Res*, v. 2, n. 3, p. 105-12, 2005.
115. REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, v. 37, n. 12, p. 1595-607, 1988.
116. RIEDIGER, T.; TRAEBERT, M.; SCHMID, H. A.; SCHEEL, C.; LUTZ, T. A.; SCHARRER, E. Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett*, v. 341, n. 2, p. 151-5, 2003.
117. SALAMONE, J. D.; CORREA, M.; FARRAR, A.; MINGOTE, S. M. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 191, n. 3, p. 461-82, 2007.
118. SAMARGHANDIAN, S.; OHATA, H.; YAMAUCHI, N.; SHIBASAKI, T. Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail-pinch-induced food intake of rats. *Neuroscience*, v. 116, n. 2, p. 519-24, 2003.
119. SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; ELMQUIST, J. K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, v. 36, n. 2, p. 199-211, 2002.
120. SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The Organization of Noradrenergic Pathways from the Brain-Stem to the Paraventricular and Supraoptic Nuclei in the Rat. *Brain Research Reviews*, v. 4, n. 3, p. 275-325, 1982.
121. SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol*, v. 218, n. 2, p. 121-44, 1983.
122. SCHELBERT, K. B. Comorbidities of obesity. *Prim Care*, v. 36, n. 2, p. 271-85, 2009.
123. SILVEIRA, P.; PORTELLA, A.; DHIR, S.; CAMERON, N.; MCALISTER, K.; HELLSTROM, I.; MEANEY, M. Maternal care influences growth and metabolism at different ages. *EARLY HUMAN DEVELOPMENT*, v. 82, n. 8, p. 540-540, 2006.
124. SILVEIRA, P. P.; DA SILVA BENETTI, C.; AYRES, C.; PEDERIVA, F. Q.; PORTELLA, A. K.; LUCION, A. B.; DALMAZ, C. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav Brain Res*, v. 173, n. 2, p. 205-10, 2006.
125. SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; ASSIS, S. A.; NIETO, F. B.; DIEHL, L. A.; CREMA, L. M.; PERES, W.; COSTA, G.; SCORZA, C.; QUILLFELDT, J. A.; LUCION, A. B.; DALMAZ, C. Early life experience

- alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci*, v. 28, n. 1, p. 111-8, 2010.
126. SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; CLEMENTE, Z.; BASSANI, E.; TABAJARA, A. S.; GAMARO, G. D.; DANTAS, G.; TORRES, I. L.; LUCION, A. B.; DALMAZ, C. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav*, v. 80, n. 5, p. 739-45, 2004.
 127. SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; CLEMENTE, Z.; GAMARO, G. D.; DALMAZ, C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci*, v. 23, n. 1, p. 93-9, 2005.
 128. SILVERMAN, B. L.; METZGER, B. E.; CHO, N. H.; LOEB, C. A. Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism. *Diabetes Care*, v. 18, n. 5, p. 611-7, 1995.
 129. SMALL, D. M.; JONES-GOTMAN, M.; DAGHER, A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage*, v. 19, n. 4, p. 1709-15, 2003.
 130. SMYTHE, J. W.; ROWE, W. B.; MEANEY, M. J. 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. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 80, n. 1-2, p. 183-9, 1994.
 131. SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, v. 34, n. 8, p. 1133-43, 2009.
 132. SPIEGELMAN, D.; ISRAEL, R. G.; BOUCHARD, C.; WILLETT, W. C. Absolute fat mass, percent body fat, and body-fat distribution: which is the real determinant of blood pressure and serum glucose? *Am J Clin Nutr*, v. 55, n. 6, p. 1033-44, 1992.
 133. SRINIVASAN, M.; DODDS, C.; GHANIM, H.; GAO, T.; ROSS, P. J.; BROWNE, R. W.; DANDONA, P.; PATEL, M. S. Maternal obesity and fetal programming: effects of a high-carbohydrate nutritional modification in the immediate postnatal life of female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 295, n. 4, p. E895-903, 2008.
 134. SRINIVASAN, M.; MITRANI, P.; SADHANANDAN, G.; DODDS, C.; SHBEIR-ELDIKA, S.; THAMOTHARAN, S.; GHANIM, H.; DANDONA, P.; DEVASKAR, S. U.; PATEL, M. S. A high-carbohydrate diet in the immediate postnatal life of rats induces adaptations predisposing to adult-onset obesity. *J Endocrinol*, v. 197, n. 3, p. 565-74, 2008.
 135. STERNSON, S. M.; SHEPHERD, G. M.; FRIEDMAN, J. M. Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci*, v. 8, n. 10, p. 1356-63, 2005.

136. STICE, E.; SPOOR, S.; BOHON, C.; VELDHUIZEN, M. G.; SMALL, D. M. Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study. *J Abnorm Psychol*, v. 117, n. 4, p. 924-35, 2008.
137. STRAUSS, R. S. Childhood obesity and self-esteem. *Pediatrics*, v. 105, n. 1, p. e15, 2000.
138. STUNKARD, A. J.; WADDEN, T. A. Psychological aspects of severe obesity. *Am J Clin Nutr*, v. 55, n. 2 Suppl, p. 524S-532S, 1992.
139. SUN, Q.; VAN DAM, R. M.; SPIEGELMAN, D.; HEYMSFIELD, S. B.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Comparison of Dual-Energy X-Ray Absorptiometric and Anthropometric Measures of Adiposity in Relation to Adiposity-Related Biologic Factors. *Am J Epidemiol*, 2010.
140. SWANSON, C. J.; HEATH, S.; STRATFORD, T. R.; KELLEY, A. E. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 58, n. 4, p. 933-45, 1997.
141. SWANSON, L. W. **Brain maps III : structure of the rat brain : an atlas with printed and electronic templates for data, models, and schematics**. 3rd rev. Amsterdam ; Boston: Elsevier, Academic Press, 2004. 215 p., 1 folded leaf of plates ISBN 0126105820 (alk. paper).
142. TEQUEANES, A.; GIGANTE, D.; ASSUNÇÃO, M.; CHICA, D.; HORTA, B. Maternal anthropometry is associated with the body mass index and waist:height ratio of offspring at 23 years of age. *J Nutr*, v. 139, n. 4, p. 750-4, 2009.
143. TOMASI, D.; WANG, G. J.; WANG, R.; BACKUS, W.; GELIEBTER, A.; TELANG, F.; JAYNE, M. C.; WONG, C.; FOWLER, J. S.; VOLKOW, N. D. Association of body mass and brain activation during gastric distention: implications for obesity. *PLoS ONE*, v. 4, n. 8, p. e6847, 2009.
144. TONG, Y.; ZHAO, H. F.; LABRIE, F.; PELLETIER, G. Regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid content by sex steroids in the arcuate nucleus of the female rat brain. *Neurosci Lett*, v. 112, n. 1, p. 104-8, 1990.
145. TRAEBERT, M.; RIEDIGER, T.; WHITEBREAD, S.; SCHARRER, E.; SCHMID, H. A. Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol*, v. 14, n. 7, p. 580-6, 2002.
146. UEKI, K.; YAMAMOTO-HONDA, R.; KABURAGI, Y.; YAMAUCHI, T.; TOBE, K.; BURGERING, B. M.; COFFER, P. J.; KOMURO, I.; AKANUMA, Y.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. Potential role

- of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem*, v. 273, n. 9, p. 5315-22, 1998.
147. VARTANIAN, L. R.; SCHWARTZ, M. B.; BROWNELL, K. D. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health*, v. 97, n. 4, p. 667-75, 2007.
148. WANG, G. J.; VOLKOW, N. D.; LOGAN, J.; PAPPAS, N. R.; WONG, C. T.; ZHU, W.; NETUSIL, N.; FOWLER, J. S. Brain dopamine and obesity. *Lancet*, v. 357, n. 9253, p. 354-7, 2001.
149. WANG, Y. F.; MONTEIRO, C.; POPKIN, B. M. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 75, n. 6, p. 971-977, 2002.
150. WATANABE, S.; HOJO, M.; NAGAHARA, A. Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases. *J Gastroenterol*, v. 42, n. 4, p. 267-74, 2007.
151. WEARING, S. C.; HENNIG, E. M.; BYRNE, N. M.; STEELE, J. R.; HILLS, A. P. The impact of childhood obesity on musculoskeletal form. *Obes Rev*, v. 7, n. 2, p. 209-18, 2006.
152. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. In: ORGANIZATION, W. H. (Ed.). **WHO Technical Report Series 864**. Geneva, 2000.
153. WILKINSON, M.; WILKINSON, D.; WIESNER, G.; MORASH, B.; UR, E. Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology*, v. 81, n. 1, p. 19-30, 2005.
154. WILLERSON, J. T.; RIDKER, P. M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*, v. 109, n. 21 Suppl 1, p. II2-10, 2004.
155. WILLETT, W. C.; DIETZ, W. H.; COLDITZ, G. A. Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med*, v. 341, n. 6, p. 427-34, 1999.
156. WISE, R. A. Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 361, n. 1471, p. 1149-58, 2006.
157. WITHROW, D.; ALTER, D. A. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes Rev*, 2010.
158. WRIGHT, P.; FAWCETT, J.; CROW, R. The development of differences in the feeding behaviour of bottle and breast fed human infants from birth to two months. *Behavioural Processes*, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1980.

159. YEOMANS, M. R.; BLUNDELL, J. E.; LESHEM, M. Palatability: response to nutritional need or need-free stimulation of appetite? *Br J Nutr*, v. 92 Suppl 1, p. S3-14, 2004.
160. ZHANG, M.; BALMADRID, C.; KELLEY, A. E. Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. *Behav Neurosci*, v. 117, n. 2, p. 202-11, 2003.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1: Artigo submetido

10.1.1 Comprovação de submissão

Elsevier Editorial SystemTM 07/12/10 07:14

Psychoneuroendocrinology Contact us Help ?

» Live TrainingDesk session on: Find Reviewers Tool in EES
» Register for our December sessions [here](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: ppsraty
Role: Author

Submissions Being Processed for Author Patricia Pelufo Silveira, MD, PhD

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

| Action | Manuscript Number | Title | Initial Date Submitted | Status Date |
|--|-------------------|--|------------------------|--------------|
| View Submission View QC Results | PNEC-D-10-00415 | Early origins of obesity - neonatal overfeeding persistently programs palatable food intake and the mesolimbic dopaminergic system | Dec 07, 2010 | Dec 07, 2010 |

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

[<< Author Main Menu](#)

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#)

<http://ees.elsevier.com/pnec/default.asp> Página 1 de 1

10.1.2 Corpo do artigo

Early origins of obesity – neonatal overfeeding persistently programs palatable food intake and the mesolimbic dopaminergic system.

Portella AK¹, Cardoso S¹, Bittencourt V¹, Werlang I¹, Dalmaz C², Fontella FF¹,
Silveira PP^{1,2}, Goldani MZ¹.

¹Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina and ²Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Running Title: Early overfeeding, palatable food intake and dopamine.

Corresponding author:

Patrícia Pelufo Silveira

Departamento de Pediatria e Puericultura, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco, 90035-903 Porto Alegre, Brazil; Phone 051-3359-8515. Fax 051-3359-8001

E-mail: 00032386@ufrgs.br

SUMMARY

Hedonic and homeostatic food intakes are independent factors involved in the development of obesity. Although it is well known that early life overfeeding increases food intake in adulthood, little is known about its impact on the palatable food preference in adulthood. We aimed at verifying hedonic feeding behavior in this model, and correlate it to the dopaminergic mesocorticolimbic functioning, involved in its regulation. Rat litters were standardized to 4 (small litter -SL) or 8 pups (control -NL) at postnatal day 1. Weaning was at day 21, and all tests were conducted after day 84 of life. Prior to testing, rats were habituated to the sweet pellets. We measured regular chow intake, and the preference of sweet food versus the regular chow in the homecage, over 24h. Sweet food intake also was measured after 1min. tail-pinch stress. Locomotion was assessed in an automated box. The ventral tegmentar area (VTA) and nucleus accumbens were micro dissected from frozen brain slices. Muscular tissue was also dissected for assessing the phosphorylation of Akt. Akt, pAkt, TH and pTH proteins were assessed by Western-blot. The abdominal fat content was dissected and weighed. SL rats were heavier than NL at all time points and had increased abdominal fat at sacrifice ($p=0.035$). Locomotor activity was not different with regard to total distance, but SL rats spent more time in the center of the box, an indicative of less anxiety ($p=0.036$). No difference was found in chow ($p=0.085$) or sweet food intake at baseline ($p=0.65$). SL had higher intake of sweet pellets in a two food choice paradigm ($p=0.017$) and in response to tail pinch stress (test x group interaction, $p=0.006$). TH was higher in SL rats' VTA ($p=0.026$) and in nucleus accumbens ($p=0.022$). pTH in the nucleus accumbens was not different between the groups ($p=0.578$). SL animals had decreased Pan-Akt in the muscle, which suggest a latent peripheral insulin resistance. Exposure to overfeeding during the neonatal period

decreases anxiety, induces obesity and programs the feeding behavior persistently, in such a way that the animals eat more palatable food. These results are associated with a higher TH protein content and transport in these animals, which suggests that the dopaminergic mesolimbic circuitry may be involved in the behavioral findings.

Keywords: early overfeeding, dopamine, feeding behavior

INTRODUCTION

Overweight, even at very young ages, is becoming increasingly prevalent (Mei, Scanlon et al. 1998; Flegal, Carroll et al. 2002; Hedley, Ogden et al. 2004; Kim, Peterson et al. 2006). In a cohort study, rapid weight gain from ages 0 to 4 months was associated with overweight at age 7 and in young adulthood (Stettler, Kumanyika et al. 2003). Originally described in the developed world, today this epidemic affects also developing countries (Bettioli, Sabbag Filho et al. 2007). The first few years of life constitute an important period for the development of overweight in childhood and its long-term health consequences.

Much interest has been directed to the developmental origins of health and disease (DOHaD). At first, studies focused on the effects of being born small, such as an increased risk for developing overweight and its metabolic consequences later in life (Hales and Barker 1992). However, more recently, researchers are also exploring the idea that exaggerated neonatal nutrition is another possible trigger for these metabolic disorders (Vickers, Breier et al. 2000; Rodrigues, De Souza et al. 2007; Rodrigues, de Moura et al. 2009; Glavas, Kirigiti et al. 2010). Therefore, environmental modifications during ‘critical periods’ of development, especially early overfeeding and rapid weight gain early in life may permanently increase the risk of overweight and associated diseases (Plagemann, Harder et al. 1999; Boullu-Ciocca, Dutour et al. 2005; Plagemann 2005; Singhal, Cole et al. 2007).

An established animal model for the study of these effects is to raise rats in ‘small litters’ as opposed to normal litters. The artificial reduction of the natural litter size to half of the number of pups per nest promotes early overfeeding and consequent early hyperglycaemia, rapid fat accumulation, and obesity (Plagemann, Harder et al.

1999; Boullu-Ciocca, Dutour et al. 2005; Plagemann 2005). Into adulthood, these rats present persistent alterations such as overweight, hyperphagia, glucose intolerance, hyperinsulinemia, dyslipidemia (Plagemann, Harder et al. 1999), increased blood pressure and glomerulosclerosis (Boubred, Daniel et al. 2009). Epigenetic modifications seem to mediate these findings, with hypermethylation of the insulin receptor promoter in the hypothalamus (Plagemann, Roepke et al. 2010) and of the two Sp1-related binding sequences essential for the mediation of leptin and insulin effects on hypothalamic POMC expression (Plagemann, Harder et al. 2009).

The central regulation of food intake, metabolism and ultimately body weight gain is mainly processed in hypothalamic and brainstem nuclei (review in Saper, Chou et al. 2002)). In addition, other CNS regions participate in modulating the motivational and emotional components of food intake. The ventral tegmentar area – nucleus accumbens circuit appears to be crucial in promoting the intake of palatable foods as well as regulating the duration of meal consumption (Meguid, Fetissof et al. 2000; Grigson 2002; Saper, Chou et al. 2002). Sweet and fatty foods potentiate the release of dopamine (DA), induce more pleasurable subjective feelings, and therefore are more rewarding (Martel and Fantino 1996; Grigson 2002). Mammals, including humans, will eat beyond their homeostatic caloric needs if presented with highly palatable food (Saper, Chou et al. 2002). Indeed, systematic reviews exploring the relationship between the consumption of sugar-sweetened beverages and health outcomes report that higher intakes are associated with greater energy intake, higher body weight, lower intake of other nutrients, and worse health indexes in children and adults (Malik, Schulze et al. 2006; Vartanian, Schwartz et al. 2007).

Reports from the last decade have shown associations between genetic variations of genes related to the dopaminergic system and increased food

consumption and body weight in humans (Jonsson, Nothen et al. 1999; Levitan, Masellis et al. 2004). In addition, fMRI studies show that women who gained weight over a 6-month period have a reduction in the striatal response to palatable food consumption (Stice, Spoor et al. 2008). There is evidence that early life events can modulate mesolimbic DA metabolism and palatable food ingestion and in animals and humans (Barbieri, Portella et al. 2009; Silveira, Portella et al. 2010). In the present investigation we therefore hypothesized that alterations to the neonatal nutritional environment, as induced by raising the rats in litters of different sizes, would alter the behavioral response to sweet food in adult rats and this would be reflected in changes in the central regulation of the dopaminergic mesolimbic pathways. To evaluate our hypothesis, we first confirmed that rats overfed in small litters develop abdominal obesity, then tested regular and palatable food consumption in different situations, and finally investigated the tyrosine-hydroxylase content (the enzyme responsible for catalyzing the formation of DOPA, precursor of dopamine) in the ventral tegmentar area and nucleus accumbens, areas related to motivation and reward.

METHODS

Animals

Wistar rat matrices (60 days, 180-200g), were obtained from Universidade Federal de Pelotas and acclimatized to our rat facility (Unidade de Experimentação Animal - Hospital de Clínicas de Porto Alegre) for 2 weeks prior to mating. All rats were housed in Plexiglas cages in groups of 2-4 rats, under a temperature of 25 \pm 2 °C and humidity of 35%. Cage floor was covered with wood chips, and cleaning was done 2-3 times per week. Food and water were left *ad libitum*. After mating, the females were

left in single cages until giving birth. At day 1 after birth, litters were culled to 4 animals (3 male and 1 female per litter) in the small litter group (SL), and to 8 pups (5-6 males and 3-2 females) in the normal litter group (NL). Weaning occurred at day 21, when rats were separated by gender. Only males were used in these studies. Body weight was measured weekly until day 84 of life, and at sacrifice (day 110-120). In these experiments we used 55 offspring from 18 litters, having no more than 2 pups per group per experiment. All the experiments were performed after 60 days of life. When rats were subjected to more than one behavioral task, it was given at least one week of recovery between the tasks. The project was approved by the local Ethics Committee (Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, project 09-409).

Standard chow intake and body weight

Food intake was measured by leaving a previously known amount of food in the cage cover and measuring the remaining after the desired period. Care was taken to start the measurement in a clean cage and to search the cage for food spills afterwards. Initial food intake was measured for a period of 24h, with the rats in their usual groups of 3-4 littermates, and the amount was presented as an average per cage per rat. Body weight was measured weekly using a digital scale with a precision of 0.01g.

Sweet food habituation and preference test

Prior to testing for the sweet food consumption, the animals were habituated to the new food, as described before (Silveira, Portella et al. 2004). Baseline preference test

was done by placing 50g of sweet pellets (Froot Loops®, Kellogs) and 50g of regular habitual chow, in the cage cover, and measuring the remaining after 24h.

Sweet food consumption in response to tail pinch stress:

A subset of animals was submitted to tail pinch stress, which consisted of pinching the region between 2-3 cm from the base of the tail for the period of 1min, with a wooden clothespin, then measuring the sweet food intake for 1h in the presence of standard rat chow, and the preference for the following 23h.

Open Field test

A separate group of animals was tested for locomotor activity and anxiety using the open field paradigm in an automated apparatus (EP-149 IR, Insight Equipamentos Científicos LTDA, Ribeirão Preto, SP). Tests were performed in two days, being the first day considered as training for novelty exposure with duration of 5 minutes and the following day as the testing with duration of 30 minutes. Total locomotion measured in distance traveled, central versus peripheral locomotion as well as habituation over the 2 days were evaluated. The open field was thoroughly cleaned with 30% ethanol between trials and between different animals.

Western blot

Muscle samples or brains of fast-decapitated rats were flash frozen in isopentane under dry ice, and stored at -80°C freezer until analysis. Three to five brain slices measuring between 120-180 µm were cut in a cryostat, and bilateral punches (1mm diameter) of the nucleus accumbens (nAcc), and ventral-tegmental area (VTA) were obtained, using the Swanson Atlas as a guide (Swanson 2004).

Tissue samples were homogenized in a cytosolic extraction buffer with protease (Complete, Roche) and phosphatase inhibitors (Phostop, Roche). Total protein was quantified using a BCA kit with bovine serum albumin as a standard (Sigma-Aldrich). Samples containing 20 µg of total protein were loaded on 4% to 15% polyacrylamide gradient gels (Invitrogen), submitted to electrophoresis and then transferred to a nitrocellulose membrane (GE Helthcare). A standard molecular weight (Magic Marker, Invitrogen) was run simultaneously for comparing molecular weights of the visualized proteins. Blots were blocked in a Tris-Base solution containing 5% non-fat milk concentrate and 1% Tween-20. The membranes were incubated with appropriate primary antibodies against Thyrosine Hydroxylase (Sigma-Aldrich) 1:8000, pTH (Millipore) 1:2000, AKT (Cell Signaling) 1:2000 and pAKT (Cell Signaling) 1:2000. The intensity of Western blot bands was quantified by densitometric analysis using the program ImageJ (National Institute of Health, USA). Results were expressed as the ratio of intensity of the protein of interest to that of α -Tubulin 1:2000 (SNC samples) (Sigma-Aldrich) or actin 1:2000 (muscle samples) (Sigma-Aldrich) from the same sample.

Statistical analyses

Continuous data in a one-factor model was analyzed by Student t-Test with litter size as the between factor (abdominal obesity, standard chow and sweet food intakes, preference test, open field test, TH and pTH). For analysis of the sweet food consumption in response to tail pinch and the muscle Akt/pAkt, it was used a Two-Way ANOVA with group and condition (presence or absence of tail pinch, saline or insulin injection) as factors. Repeated measures ANOVA was used for analysis of

body weight measures (group and time as factors). Data was presented as mean and SEM. Statistical significance was set at $p=0.05$.

RESULTS

Standard chow intake and body weight

As plotted in Figure 1, all rats gained weight as the time passed by. A Repeated Measures ANOVA (Time X Group), showed a main effect of time ($F(1,53)=3730.634$; $p<0.001$). However, a significant time X group interaction ($F(1,53)=1.912$, $p=0.048$) demonstrated that SL animals are heavier than NL rats from early age (Fig 1). Hence, there was no difference in the consumption of standard lab chow between the groups (NL= $24,47\pm 0,48$ g/24h, SL= $25,74\pm 0,48$ g/24h; Student T-test, $t=-1.843$ $p=0.084$, NL $n=8$, SL $n=10$).

Food preference test

Figure 2 illustrates the preference test. Student T-test showed again that there is no difference in the consumption of rat chow between NL and SL animals ($t=0.062$ $p=0.8$, NL $n=25$, SL $n=25$), but SL animals eat more sweet pellets than do NL rats when having these two types of food available ($t =2.481$ $p=0.017$). Therefore, SL animals eat more total calories than NL rats ($t =6.8$ $p=0.012$), due to an increased consumption of sweet food.

Sweet food consumption in response to tail pinch stress

Considering a Two Way ANOVA (group X tail-pinch condition), there was no group effect ($F(1,32)=0.566$, $p=0.457$), no tail-pinch effect ($F(1,32)=0.85$), but a significant group versus tail-pinch interaction ($F(1,32)=19.317$, $p=0.006$), demonstrating that SL animals eat more sweet pellets in response to the tail pinch stress than do NL rats (Figure 3).

Open Field test

The total distance travelled during the 30 minutes of exposure to the Open Field apparatus was not different between the groups (NL= $9,88\pm 0,59$ m, SL= $9,83\pm 0,35$ m; Student T-test, $t=0.072$ $p=0.942$, NL $n=26$, SL $n=28$). However, SL rats spend more in the center of the apparatus (NL= $19,5\pm 1,39\%$ of the time in the center, SL= $26,4\pm 2,81\%$; Student T-test, $t=2.153$ $p=0.036$), demonstrating a behavior compatible with decreased levels of anxiety.

Abdominal fat deposition, peripheral insulin resistance

Adult SL animals had increased depots of abdominal fat as compared to NL rats (NL= $1,87\pm 0,05\%$ of body weight as abdominal fat, SL= $2,0\pm 0,07\%$; Student T-test, $t=2.186$ $p=0.034$, NL $n=26$, SL $n=28$). Figure 4 displays the results of the peripheral insulin challenge. For muscle Pan-AKT, two Way ANOVA demonstrated a group effect ($F(1,24)=4.466$, $p=0.047$), in which NL animals have increased levels of the protein, without a drug effect ($F(1,24)=0.492$ $p=0.491$) and no group versus drug interaction ($F(1,24)=0.241$, $p=0.648$), NL-Saline $n=6$, NL-insulin $n=6$, SL-saline $n=7$, SL-insulin $n=6$, (Figure 4a). For pAKT, there was no group effect ($F(1,23)=2.717$, $p=0.115$) and no group versus drug interaction ($F(1,23)=0.104$, $p=0.67$), but a drug effect was observed as expected ($F(1,23)=12.186$ $p=0.002$), in which all animals that

received insulin have increased phosphorylation of AKT compared with their saline-treated counterparts. (Figure 4b).

Central TH and pTH

Figure 5 plots the results for tyrosine hydroxylase protein content in the VTA and Nacc punches. For the VTA, it was observed that SL animals have increased TH protein content when compared to NL rats (Student T-test, $t=-2.85$ $p=0.016$). In the nucleus accumbens, the same effect was observed (Student T-test, $t=-2.62$ $p=0.022$). However, there was no difference in the phosphorylated form of the protein between the groups in the Nacc (Student T-test, $t=-0,573$ $p=0,578$, Figure 6).

DISCUSSION

Our study aimed at investigating the phenotype of an early life obesity model with regards to feeding behavior, especially in relation to its hedonic component. We saw that SL adult animals were heavier and had increased abdominal fat depots as compared to their NL counterparts, and this was accompanied by an altered feeding behavior especially concerning the hedonic food consumption. SL rats had an increased preference for sweet food in adult life, as well as increased sweet consumption when challenged in a situation of mild acute stress. SL animals also showed an exploratory behavior compatible with a reduction in anxiety, which was already shown by others (Spencer and Tilbrook 2009). Finally, we showed an increased content of tyrosine-hydroxylase in the ventral tegmentar area and nucleus accumbens, mesolimbic brain areas that regulate the hedonic component of feeding behavior.

The tail-pinch stress was chosen as a stressor because it increases dopamine release (Louilot, Le Moal et al. 1986; D'Angio, Serrano et al. 1987) and eating is the predominant response to tail-pinch (Antelman and Szechtman 1975; Antelman, Szechtman et al. 1975; Rowland and Antelman 1976; Nemeroff, Osbahr et al. 1978; Levine and Morley 1981). In this study we showed that animals that were overfed during the neonatal period by reducing the litter size demonstrate, as adults, an increased consumption of sweet food in response to tail pinch stress. This may suggest that the mesolimbic dopaminergic system is sensitized in these animals. To strengthen our findings, we saw that SL rats had an increased content of TH in this brain system. These results are in accordance with human reports of altered striatal dopaminergic functioning in obese individuals (Wang, Volkow et al. 2001). In humans, it is suggested that decreases in striatal D2 receptors found in obese individuals could contribute to overeating by modulating the striatal prefrontal pathways, which participate in inhibitory control and salience attribution (Volkow, Wang et al. 2008). Interestingly, in our model, SL rats ate more sweet when given the choice between palatable and regular chow, suggesting that they may be less able to refrain from consuming preferred foods when given the option. The lack of difference in pTH between the groups may reflect simply the fact that the tissue was collected under baseline conditions.

Apparently conversely to what we found is the fact that food restriction strongly increases mRNA levels of tyrosine hydroxylase in the ventral tegmental area (Lindblom, Johansson et al. 2006). However, based in the central TH and abdominal obesity results, it could be proposed that SL animals are “wasted” in a metabolic context of plenty. One could argue that this paradoxical scenario would be possible if these animals were insulin resistant in striatal areas. This is a possibility that remain to

be explored. Indeed, as depletion of long-term rather than short-term energy stores seems to be involved in the sensitization of the reward system after food restriction (Fulton, Richard et al. 2004), it is possible that the observed effects on the mesolimbic dopamine system are mediated by adipostatic hormones such as leptin and insulin, directly or indirectly by means of neuropeptides sensitive to changes in body weight, for instance (Figlewicz, Evans et al. 2003; Fulton, Pissios et al. 2006). Therefore, the already reported alterations in hypothalamic insulin sensitivity (Plagemann, Roepke et al. 2010) in these animals may be also happening at the level of the VTA.

The neonatal overfeeding model was already shown to induce profound alterations in the regulation of homeostatic food intake (Plagemann, Harder et al. 1999; Plagemann 2005; Plagemann, Harder et al. 2009; Plagemann, Roepke et al. 2010), however the mesolimbic hedonic control of palatable food had never been explored in these animals. Interestingly, it is known that the lateral hypothalamic area (LHA) is involved in the incentive salience of food and other rewards by modulating the striatal and VTA responses to food (Mieda and Yanagisawa 2002; Georgescu, Sears et al. 2005). Neonatal overfeeding affects the firing of lateral hypothalamic neurons in response to cholecystokinin and serotonin (Zippel, Heidel et al. 2001), and therefore an altered functioning of the LHA and consequent peculiar modulation of the VTA in these animals could explain the finding of our study.

Recent evidence suggests that brain reward circuits can be activated with natural rewards like food, just as they can with drugs of abuse (Holden 2001; Grigson 2002; Volkow and Wise 2005). In our study, SL animals seem to be more prone to ingest palatable foods and have an altered regulation of the mesolimbic TH content. Other interventions during the neonatal period also affect food preferences in adulthood and the mesolimbic dopamine metabolism (Silveira, Portella et al. 2010).

Considering that early life programming seems to be an important mechanism leading to overweight and obesity (Beall, El Haddad et al. 2004; Desai, Gayle et al. 2005; Plagemann 2008; Plagemann, Harder et al. 2009), we propose that early life overnutrition, as well as other types of neonatal events, programs the functioning of the brain reward circuitry, increasing the preference for palatable foods in adulthood and contributing to the development of obesity and related disorders.

In times of obesity epidemics and plenty availability of calorically dense, highly palatable foods, it is of extreme importance to understand the variations in the vulnerability to obesity. As the fetal environment is well recognized to contribute importantly to health and disease predisposition later in life, we should widely acknowledge that early overnutrition has also important and persistent effects, programming feeding behavior (specifically adult feeding preferences and palatable food intake), as well as increasing obesity risk.

REFERENCES

- Antelman, S. M. and H. Szechtman (1975). "Tail pinch induces eating in sated rats which appears to depend on nigrostriatal dopamine." Science **189**(4204): 731-733.
- Antelman, S. M., H. Szechtman, et al. (1975). "Tail pinch-induced eating, gnawing and licking behavior in rats: dependence on the nigrostriatal dopamine system." Brain Res **99**(2): 319-337.
- Barbieri, M. A., A. K. Portella, et al. (2009). "Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women." Pediatr Res **65**(2): 215-220.
- Beall, M. H., M. El Haddad, et al. (2004). "Adult obesity as a consequence of in utero programming." Clin Obstet Gynecol **47**(4): 957-966; discussion 980-951.
- Bettioli, H., D. Sabbag Filho, et al. (2007). "Do intrauterine growth restriction and overweight at primary school age increase the risk of elevated body mass index in young adults?" Braz J Med Biol Res **40**(9): 1237-1243.
- Boubred, F., L. Daniel, et al. (2009). "Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats." Am J Physiol Renal Physiol **297**(4): F943-951.
- Boullu-Ciocca, S., A. Dutour, et al. (2005). "Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome." Diabetes **54**(1): 197-203.
- D'Angio, M., A. Serrano, et al. (1987). "Tail-pinch stress increases extracellular DOPAC levels (as measured by in vivo voltammetry) in the rat nucleus accumbens but

not frontal cortex: antagonism by diazepam and zolpidem." Brain Res **409**(1): 169-174.

Desai, M., D. Gayle, et al. (2005). "Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(1): R91-96.

Figlewicz, D. P., S. B. Evans, et al. (2003). "Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat." Brain Res **964**(1): 107-115.

Flegal, K. M., M. D. Carroll, et al. (2002). "Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000." JAMA **288**(14): 1723-1727.

Fulton, S., P. Pissios, et al. (2006). "Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway." Neuron **51**(6): 811-822.

Fulton, S., D. Richard, et al. (2004). "Food restriction and leptin impact brain reward circuitry in lean and obese Zucker rats." Behav Brain Res **155**(2): 319-329.

Georgescu, D., R. M. Sears, et al. (2005). "The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance." J Neurosci **25**(11): 2933-2940.

Glavas, M. M., M. A. Kirigiti, et al. (2010). "Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet." Endocrinology **151**(4): 1598-1610.

Grigson, P. S. (2002). "Like drugs for chocolate: separate rewards modulated by common mechanisms?" Physiol Behav **76**(3): 389-395.

Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." Diabetologia **35**(7): 595-601.

- Hedley, A. A., C. L. Ogden, et al. (2004). "Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002." JAMA **291**(23): 2847-2850.
- Holden, C. (2001). "'Behavioral' addictions: do they exist?" Science **294**(5544): 980-982.
- Jonsson, E. G., M. M. Nothen, et al. (1999). "Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers." Mol Psychiatry **4**(3): 290-296.
- Kim, J., K. E. Peterson, et al. (2006). "Trends in overweight from 1980 through 2001 among preschool-aged children enrolled in a health maintenance organization." Obesity (Silver Spring) **14**(7): 1107-1112.
- Levine, A. S. and J. E. Morley (1981). "Stress-induced eating in rats." Am J Physiol **241**(1): R72-76.
- Levitan, R. D., M. Masellis, et al. (2004). "Childhood inattention and dysphoria and adult obesity associated with the dopamine D4 receptor gene in overeating women with seasonal affective disorder." Neuropsychopharmacology **29**(1): 179-186.
- Lindblom, J., A. Johansson, et al. (2006). "Increased mRNA levels of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter in the VTA of male rats after chronic food restriction." Eur J Neurosci **23**(1): 180-186.
- Louilot, A., M. Le Moal, et al. (1986). "Differential reactivity of dopaminergic neurons in the nucleus accumbens in response to different behavioral situations. An in vivo voltammetric study in free moving rats." Brain Res **397**(2): 395-400.
- Malik, V. S., M. B. Schulze, et al. (2006). "Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review." Am J Clin Nutr **84**(2): 274-288.

- Martel, P. and M. Fantino (1996). "Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study." Pharmacol Biochem Behav **53**(1): 221-226.
- Meguid, M. M., S. O. Fetissov, et al. (2000). "Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake." Nutrition **16**(10): 843-857.
- Mei, Z., K. S. Scanlon, et al. (1998). "Increasing prevalence of overweight among US low-income preschool children: the Centers for Disease Control and Prevention pediatric nutrition surveillance, 1983 to 1995." Pediatrics **101**(1): E12.
- Mieda, M. and M. Yanagisawa (2002). "Sleep, feeding, and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors." Curr Opin Neurobiol **12**(3): 339-345.
- Nemeroff, C. B., A. J. Osbahr, 3rd, et al. (1978). "Cholecystokinin inhibits tail pinch-induced eating in rats." Science **200**(4343): 793-794.
- Plagemann, A. (2005). "Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity." Physiol Behav **86**(5): 661-668.
- Plagemann, A. (2008). "A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation." J Matern Fetal Neonatal Med **21**(3): 143-148.
- Plagemann, A., T. Harder, et al. (2009). "Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome." J Physiol **587**(Pt 20): 4963-4976.
- Plagemann, A., T. Harder, et al. (1999). "Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats." Brain Res **836**(1-2): 146-155.
- Plagemann, A., K. Roepke, et al. (2010). "Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding." J Perinat Med **38**(4): 393-400.

Rodrigues, A. L., E. G. de Moura, et al. (2009). "Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats." J Physiol **587**(Pt 11): 2647-2661.

Rodrigues, A. L., E. P. De Souza, et al. (2007). "Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition." J Endocrinol **195**(3): 485-494.

Rowland, N. E. and S. M. Antelman (1976). "Stress-induced hyperphagia and obesity in rats: a possible model for understanding human obesity." Science **191**(4224): 310-312.

Saper, C. B., T. C. Chou, et al. (2002). "The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating." Neuron **36**(2): 199-211.

Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2010). "Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism." Int J Dev Neurosci **28**(1): 111-118.

Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2004). "Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats." Physiol Behav **80**(5): 739-745.

Singhal, A., T. J. Cole, et al. (2007). "Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure?" Circulation **115**(2): 213-220.

Spencer, S. J. and A. Tilbrook (2009). "Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness." Psychoneuroendocrinology **34**(8): 1133-1143.

Stettler, N., S. K. Kumanyika, et al. (2003). "Rapid weight gain during infancy and obesity in young adulthood in a cohort of African Americans." Am J Clin Nutr **77**(6): 1374-1378.

Stice, E., S. Spoor, et al. (2008). "Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study." J Abnorm Psychol **117**(4): 924-935.

Swanson, L. W. (2004). Brain maps III : structure of the rat brain : an atlas with printed and electronic templates for data, models, and schematics. Amsterdam ; Boston, Elsevier, Academic Press.

Vartanian, L. R., M. B. Schwartz, et al. (2007). "Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis." Am J Public Health **97**(4): 667-675.

Vickers, M. H., B. H. Breier, et al. (2000). "Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(1): E83-87.

Volkow, N. D., G. J. Wang, et al. (2008). "Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: possible contributing factors." Neuroimage **42**(4): 1537-1543.

Volkow, N. D. and R. A. Wise (2005). "How can drug addiction help us understand obesity?" Nat Neurosci **8**(5): 555-560.

Wang, G. J., N. D. Volkow, et al. (2001). "Brain dopamine and obesity." Lancet **357**(9253): 354-357.

Zippel, U., E. Heidel, et al. (2001). "Action of CCK and 5-HT on lateral hypothalamic neurons depends on early postnatal nutrition." Nutr Neurosci **4**(2): 143-152.

LEGENDS TO FIGURES:

Figure 1. Body weight of rats raised in normal (NL) and small (SL) litters. Repeated Measures ANOVA (time X group), main effect of time ($F(1,53)=3730.634$; $p<0.001$) and time X group interaction ($F(1,53)=1.912$, $p=0.048$). NL $n=27$, SL $n=28$. Data are mean \pm SEM.

Figure 2. Food preference test, showing regular chow versus sweet food intake of rats raised in normal (NL) and small (SL) litters. Student T-test, $t=2.481$ $p=0.017$, NL $n=25$, SL $n=25$ for NL versus SL sweet food intake. Data are mean \pm SEM.

Figure 3. 1h sweet food intake of rats raised in normal (NL) and small (SL) litters, subjected or not to tail-pinch stress. Two Way ANOVA (group X test), showing group X test interaction $F(1,32)=19.317$, $p=0.006$. NL-no TP $n=9$, NL-TP $n=8$, SL-no TP $n=9$, SL- TP $n=10$. Data are mean \pm SEM.

Figure 4. Muscle pan-AKT and p-AKT of rats raised in normal (NL) and small (SL) litters, subjected or not to 5u/kg IP insulin challenge. A) pan-AKT protein levels are increased in NL rats, (Two Way ANOVA, group effect ($F(1,24)=4.466$, $p=0.047$). NL-Saline $n=6$, NL-insulin $n=6$, SL-saline $n=7$, SL-insulin $n=6$. B) phosphorilated AKT, effect of the drug ($F(1,23)=12.186$ $p=0.002$), $n=6$ per group.

Figure 5. TH protein levels in the VTA and Nucleus Accumbens (Acc). TH is increased in SL rats, in both VTA (Student T-test, $t=2.85$ $p=0.016$, NL $n=7$, SL $n=6$) and Acc (Student T-test, $t=-2.62$ $p=0.022$, NL $n=7$, SL $n=7$).

Figure 6. phosphorilated TH protein levels in Nucleus Accumbens (Acc) of rats,
Student T-test, $t=-0.573$ $p=0.578$, NL $n=7$, SL $n=6$.

Figure 1

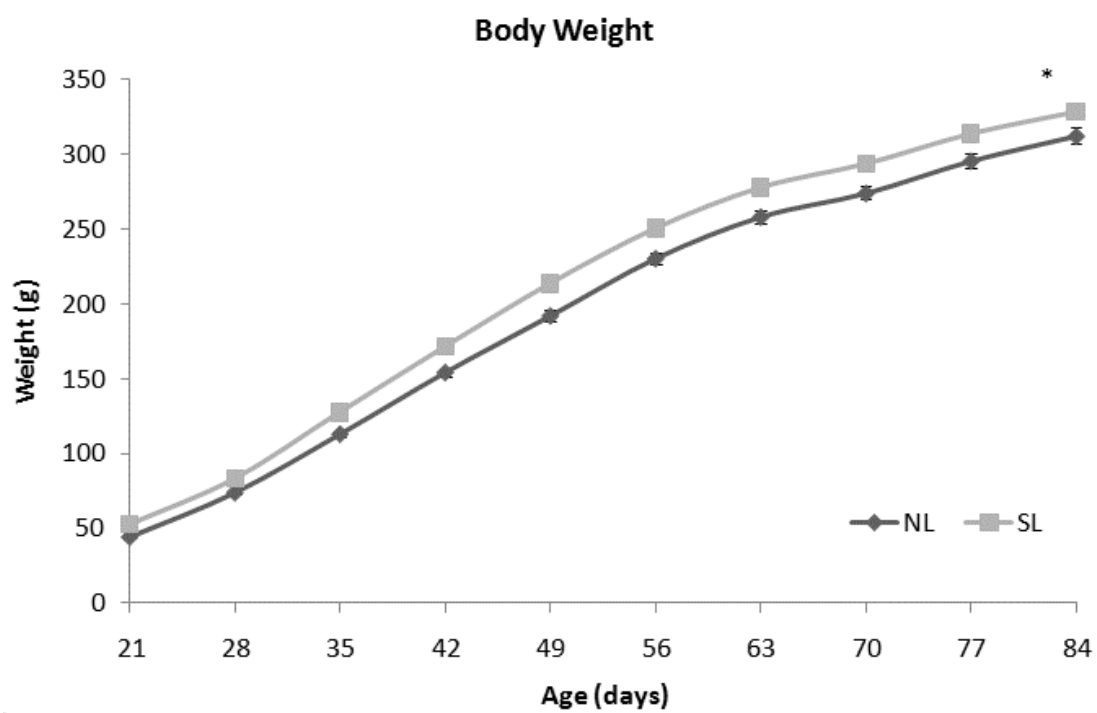


Figure 2

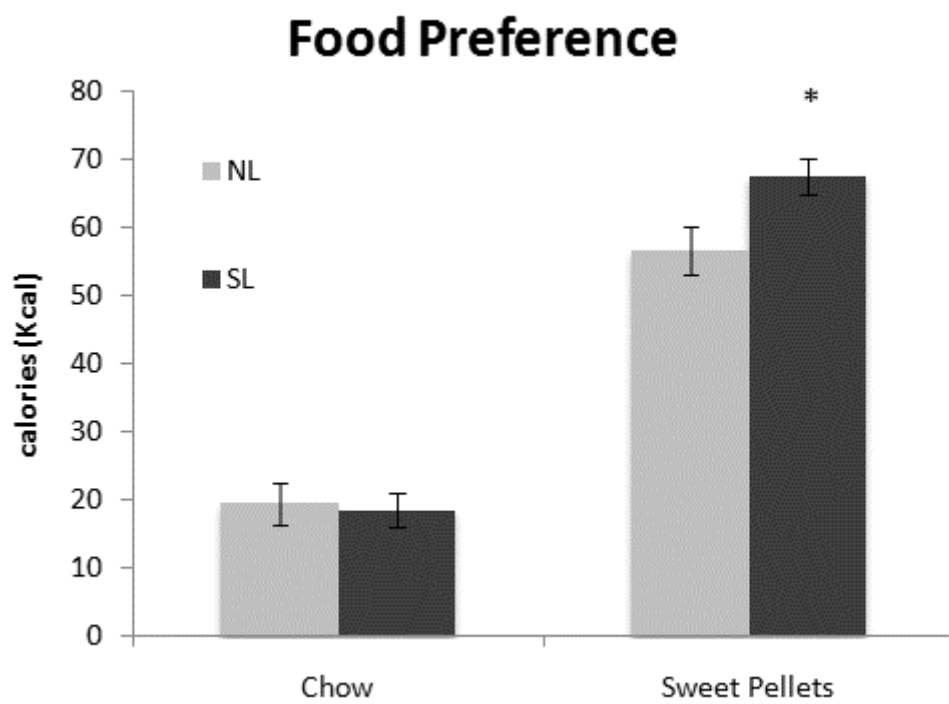


Figure 3

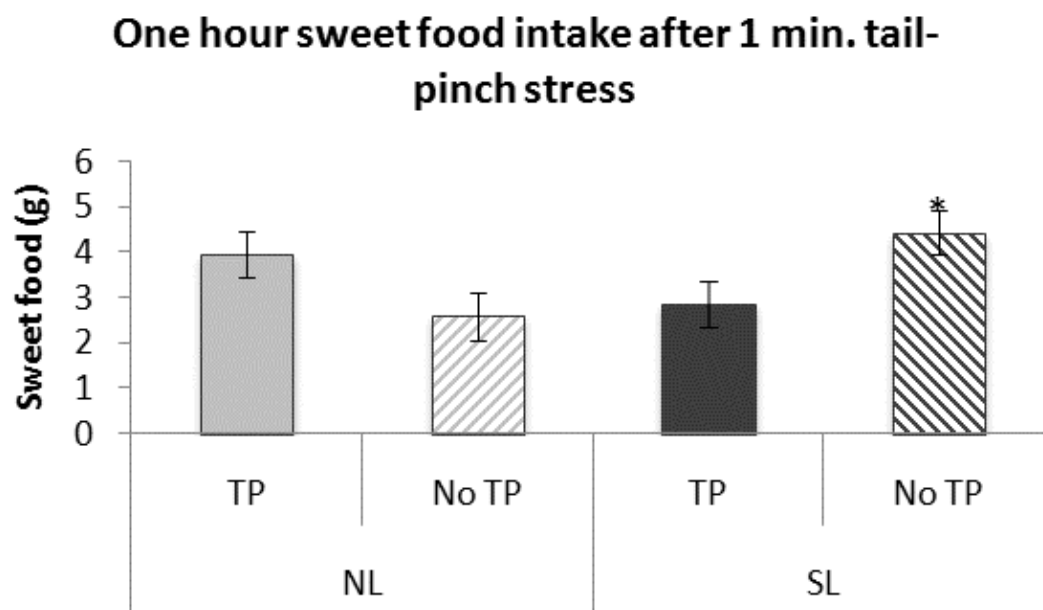


Figure 4

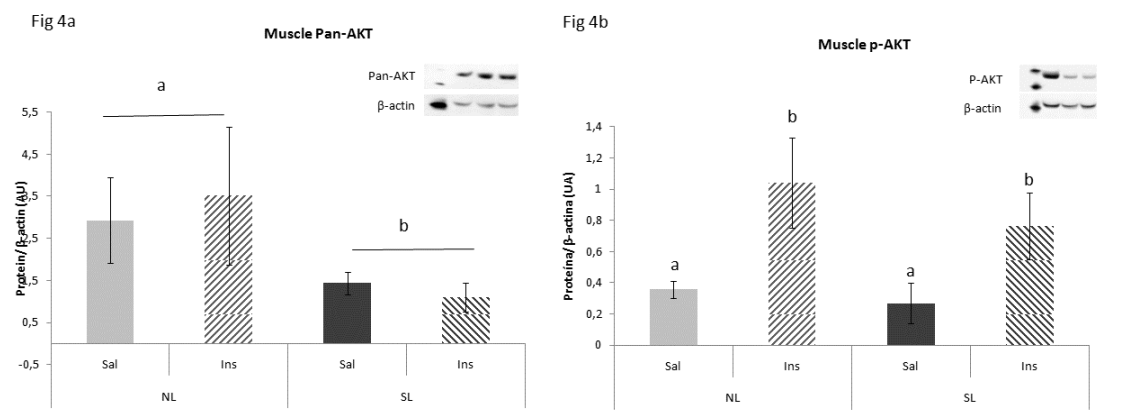


Figure 5

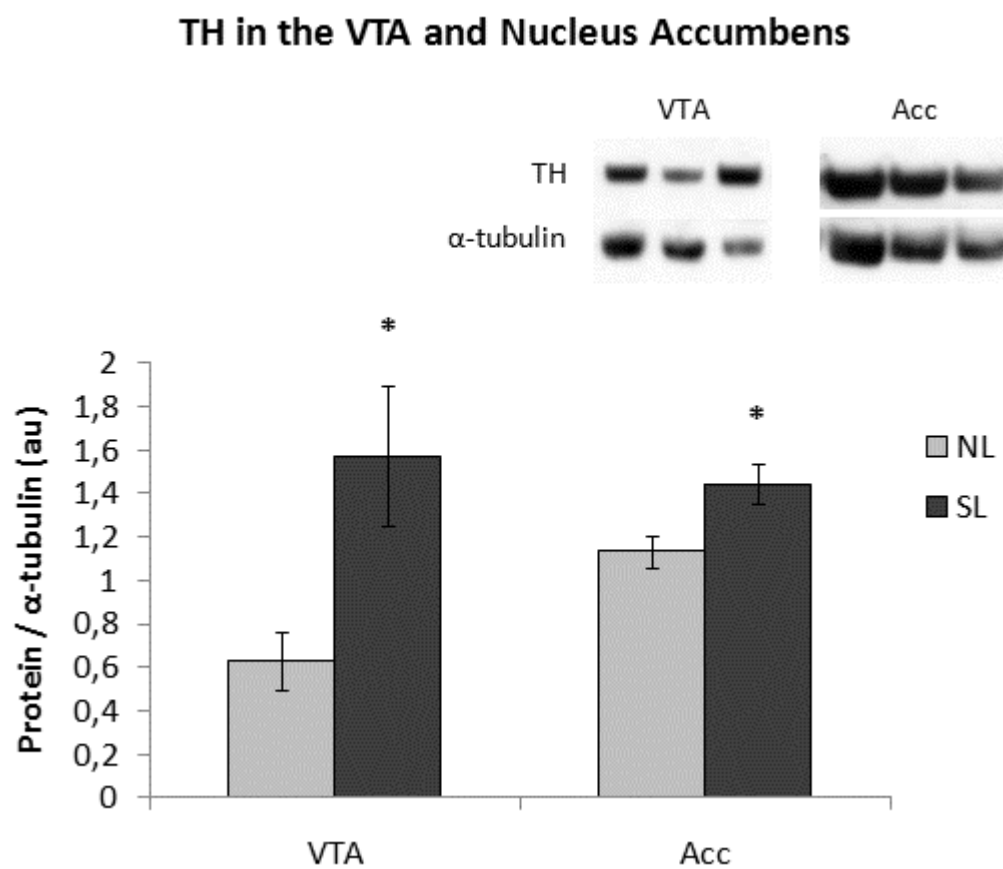


Figure 6

