

GILVANILDO ROBERTO DA SILVA

**Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica
de receptores dopaminérgicos drd1a e drd2 no núcleo accumbens
e estriado em ratos adultos**

**RECIFE
2013**

GILVANILDO ROBERTO DA SILVA

**Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica
de receptores dopaminérgicos drd1a e drd2 no núcleo accumbens
e estriado em ratos adultos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Linha de Pesquisa: Modelos Morfofisiológicos e Imunológicos das doenças.

Orientadora: Professora Dr^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Co-Orientadora: Professora Dr^a Sandra Lopes de Souza

**RECIFE
2013**

Catálogo na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586e Silva, Gilvanildo Roberto da.
Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica de receptores dopaminérgicos drd1a e drd2 no núcleo accumbens e estriado em ratos adultos / Gilvanildo Roberto da Silva. – Recife: O autor, 2013.
102 f. : il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Manuela Figueiroa Lyra de Freitas.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2013.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição proteica. 2. Expressão gênica. 3. Receptores de Dopamina D1. 4. Receptores de Dopamina D2. I. Freitas, Manuela Figueiroa Lyra de (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-058)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Mário Ribeiro de Melo-Júnior

VICE-COORDENADORA DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

RECIFE

2013

GILVANILDO ROBERTO DA SILVA

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL SOBRE
A EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS
DRD1a E DRD2 NO NÚCLEO ACCUMBENS E ESTRIADO
EM RATOS ADULTOS**

Dissertação aprovada em: 13 de Março de 2013.

Banca examinadora:

Prof. Dr^o Nicodemos Teles de Pontes Filho
Depto. de Patologia – CCS/UFPE

Prof^a Dr^a. Maria Bernadete Sousa Maia
Depto. de Farmacologia e Fisiologia – CCS/UFPE

Prof^a Dr^a. Rhowena Jane Barbosa de Matos
Núcleo de Educação Física – CAV/UFPE

**RECIFE
2013**

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida...
À minha querida e amada mãe, meu porto seguro sempre,
A ela tudo que fui, sou e serei,
À minha filhota pelo amor incondicional,
À minha esposa pelo apoio e companheirismo,
Obrigado por existirem em minha vida
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus

Primeiramente pela oportunidade de ter chegado até aqui e por ter feito minha vida valer à pena!

À professora Manuela Figueiroa

Pela disponibilidade, paciência e competência na orientação deste trabalho. Por todo conhecimento transmitido e pelas preciosas contribuições. Pelas horas de dedicação na elaboração do pré-projeto até a sua concretização. Pelas vezes que liguei ou mandei e-mail e ela tão gentilmente me atendeu. Pelos esclarecimentos e incentivos... Pela confiança depositada na minha pessoa e no meu trabalho. Pelas palavras de apoio, pelas oportunidades, pelos conselhos e sua preocupação comigo. Por saber enxergar bem as pessoas e ver o que há de melhor nelas... Mas do que orientadora, és uma amiga sempre presente. Seus atos, seus gestos, sua competência, sua inteligência, sua humildade, sua amizade e simpatia, revela a essência de uma professora exemplar, detentora de um caráter excepcional, e uma sensibilidade que é peculiar aos que possuem um grande coração. Obrigado por tudo e principalmente por ter tornado o meu sonho realidade.

À professora Sandra Lopes de Souza

Pela co-orientação e por todo empenho e dedicação nos vários momentos do desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória(CAV)

Pela formação acadêmica, iniciação científica, projetos de extensão, monitorias, tornando-me apto a ingressar na pós-graduação com um bom respaldo científico.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia

Pela alegria proporcionada de ser selecionado para fazer parte da turma do mestrado 2011, bem como pela qualidade do programa oferecido e por todo apoio e incentivo concedido para concretização do mesmo.

Aos professores Sebastião Rogerio, Rogelia Herculano Pinto, Augusto Barreto e Paula Carolina Valença do Centro Acadêmico de Vitória

Pelo apoio, incentivo, oportunidades e orientações nas quais foram vitais para alcançar meus objetivos acadêmicos.

Ao meu eterno grupo de estágio durante o período da graduação (IGM+C1)

Rita de Cássia Lins, Maria José das Neves, Fabricya Cavalcante, Gabriela Cavalcanti e Paula Elizabeth, pela rica e sincera amizade, pelos conselhos, incentivos e por ter me proporcionado momentos inesquecíveis durante nossa jornada acadêmica.

Ao anexo de anatomia

Pelos recursos e estrutura oferecida para viabilização da pesquisa.

À Professora Rhowena

Pela valiosa contribuição, gentilmente dedicada através do seu precioso tempo e esforço no processamento das análises das amostras, durante a realização do processo da RT PCR, e pela transmissão de conhecimentos e esclarecimentos acerca do tema.

À Paula Martimiano

Pela parceria nos experimentos, pelas exaustivas horas no biotério, pela responsabilidade necessária, pelas valiosas contribuições durante os experimentos, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e pela disponibilidade em me ajudar com as informações necessárias para compor o estudo. Nosso trabalho ficou lindo, tenho muito orgulho de ter trabalhado com você!

Aos colegas de turma

Em especial aqueles com quem convivi mais de perto, espero que possamos manter nossa amizade, e que todos possam ser recompensados por este título, de conquista tão difícil, ao mesmo tempo que compensador, e que compartilhem dele da forma mais altruísta possível com os que os cercam, pois daí vem o seu verdadeiro valor.

*"Acredite, que nenhum de nós
Já nasceu com jeito pra super herói
Nossos sonhos a gente é quem constrói
É vencendo os limites
Escalando as fortalezas
Conquistando o impossível pela fé"*

(Beno César)

RESUMO

A desnutrição perinatal induz adaptações neurais que são responsáveis pelas alterações da expressão gênica de receptores dopaminérgicos em áreas do cérebro envolvidas com a regulação do comportamento alimentar. Os receptores dopaminérgicos DRD1 e DRD2 são conhecidos por atuarem na via de recompensas do sistema mesolímbico controlando a ingestão alimentar. A ativação da via de recompensas cria uma sensação de prazer e interfere com os sinais fisiológicos de saciedade, o que promove o consumo maior de alimentos palatáveis. O acesso a alimentos palatáveis com alto teor energético é considerado fator de risco ambiental para a obesidade. A compreensão dos mecanismos relacionados com a expressão gênica pelos quais a vida precoce influencia no padrão de saúde do adulto tem implicações importantes na busca de medidas preventivas e de controle do comportamento alimentar e sobre o risco para determinadas doenças na vida adulta. Este trabalho analisou o efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica dos receptores dopaminérgicos DRD1a e DRD2, no núcleo accumbens e estriado em animais adultos. Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar divididos em dois grupos segundo a dieta materna oferecida no período perinatal: normonutrido n=30 (17% de caseína) e desnutrido n=30 (8% de caseína). Foram analisados o peso corporal entre 15 e 120 dias de vida, a ingestão de alimento palatável sob efeito dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 e os níveis de expressão gênica dos receptores DRD1a e DRD2 no núcleo accumbens e estriado de animais normonutridos (n=6) e desnutridos (n=7). Os animais desnutridos que foram expostos à dieta palatável sem estímulos dos agonistas D1 e D2, consumiram maior quantidade do alimento palatável em relação aos animais normonutridos. Após aplicação dos agonistas D1 e D2, houve redução no consumo da dieta palatável em ambos os grupos (normonutrido e desnutrido), entretanto o efeito anorético do agonista D1 foi atenuado nos animais desnutridos. Ocorreu aumento da expressão gênica do receptor DRD1a no núcleo accumbens e estriado de animais desnutridos, não havendo alterações significativas em relação ao receptor DRD2. Assim, a desnutrição proteica perinatal altera a expressão gênica do receptor dopaminérgico DRD1a no núcleo accumbens e estriado em ratos adultos e altera o comportamento alimentar, reduzindo a ação hipofágica do receptor dopaminérgico D1 estimulando o consumo de alimentos palatáveis.

Palavras-Chave: desnutrição proteica, expressão gênica, receptores de dopamina D1, receptores de dopamina D2.

ABSTRACT

The perinatal malnutrition induces neural adaptations that are responsible for changes in gene expression of dopamine receptors in brain areas involved in the regulation of feeding behavior. Dopamine receptors DRD1 and DRD2 are known to act via the mesolimbic reward system controlling food intake. The activation of the reward creates a feeling of pleasure and interferes with the physiological signals of satiety, which promotes greater consumption of palatable foods. The access to palatable foods with high energy content is considered environmental risk factor for obesity. The comprehension of the mechanisms related to gene expression by which early life influences on adult health standard has important implications in the search for preventive measures and control of feeding behavior and the risk for certain diseases in adult life. This study examined the effects of perinatal protein malnutrition on gene expression of dopaminergic receptors DRD1a and DRD2 in the nucleus accumbens and striatum in adult animals. A total of 60 Wistar rats were divided into two groups according to maternal diet offered in the perinatal period: nourished $n = 30$ (17% casein) and malnourished $n = 30$ (8% casein). We analyzed the body weight between 15 and 120 days of life, the intake of palatable food under the effect of D1 and D2 dopamine agonists and levels of gene expression and DRD1a DRD2 receptor in the nucleus accumbens and striatum of animals nourished ($n = 6$) and malnourished ($n = 7$). The malnourished animals that were exposed to the palatable diet without stimulation of D1 and D2 agonists, consumed greater amount of palatable food for the animals nourished. After application of D1 and D2 agonists, there was a reduction in the consumption of palatable diet in both groups (nourished and malnourished), however the anorectic effect of the D1 agonist was attenuated in malnourished animals. There was an increase in the gene expression of the receptor in the nucleus accumbens and DRD1a striatum of malnourished animals, with no significant changes over the DRD2 receptor. Thus, perinatal protein malnutrition alters gene expression of the dopamine receptor in the nucleus accumbens and DRD1a striatum in adult rats and alters eating behavior, reducing the hypophagic action of dopamine D1 receptor stimulating the palatable food consumption.

Keywords: protein malnutrition, genes expression, receptors dopamine D1, receptors dopamine D2.

LISTAS DE FIGURAS

Listas de figuras da revisão

- Figura 1** – Síntese da Dopamina..... 22
- Figura 2** – Cascata de Recompensa do Sistema Límbico..... 27

Listas de figuras do artigo de revisão

- Figura1** – Fluxograma para selecionar os artigos que foram utilizados na revisão sistemática após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão..... 43

Listas de figuras do artigo original

- Figura 1** – Peso corporal médio dos filhotes machos nascidos de fêmeas alimentadas com uma dieta normoproteica (caseína 17%) ou hipoproteica (caseína 8%) durante o período de gestação e lactação..... 74
- Figura 2** – Ingestão alimentar dos filhotes machos, aos 60 dias de vida, nascidos de fêmeas alimentadas com uma dieta normoproteica (caseína 17%) ou hipoproteica (caseína 8%) durante o período de gestação e lactação..... 74
- Figura 3** – Efeito dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 sobre o consumo de alimento palatável em animais que foram submetidos à desnutrição perinatal..... 75
- Figura 4** – Expressão gênica do receptor dopaminérgico DRD1a em relação a β -actina no NAcc e estriado. Os dados correspondem à média \pm SEM com n = 6 para animais controle (1,29 \pm 0,30) e n = 7 para animais desnutridos (1,89 \pm 0,45). test t Student para comparação entre grupos * p <0,05..... 75
- Figura 5** – Expressão gênica do receptor dopaminérgico DRD2 em relação a β -actina no NAcc e estriado. Os dados correspondem à média \pm SEM com n = 6 para animais controle (1,07 \pm 0,22) e n = 6 para animais desnutridos (1,29 \pm 0,30). test t Student para comparação entre grupos * p <0,05..... 76

LISTAS DE TABELAS

Listas de tabelas do artigo de revisão

Tabela 1 – Artigos sobre expressão gênica de receptores dopaminérgicos em áreas do cérebro, envolvidas com o comportamento alimentar em ratos, publicados entre 2001 e 2011, identificados segundo autor e ano, país, tipo de receptor, objetivo do estudo, amostra, estrutura cerebral, métodos e resultados..... 44

Listas de tabelas da dissertação

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.....47

Tabela 2 – Informação nutricional do alimento palatável.....48

Tabela 3 – Sequência de primers para os receptores DRD1a, DRD2 e β -actina utilizados na reação de PCR em Tempo Real.....52

Listas de tabelas do artigo original

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais.....76

Tabela 2 - Informação nutricional do alimento palatável.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina Trifosfato

β -actina - Beta Actina

CCS - Centro de Ciências da Saúde

cDNA - Complementary DNA

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COMT - Catecol-O-Metiltransferase

Ct - Threshold cycle

DA - Dopamina

DAT – Dopamine Transporter

DIO – Diet-induced obesity

DNA - Deoxyribonucleic Acid

GAPDH - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

L-Dopa - Levodopa

MAO - Monoamina Oxidase

mRNA - Messenger Ribonucleic Acid

NAcc – Núcleo Accumbens

PCR - Polymerase Chain Reaction

RNA - Ribonucleic Acid

RT PCR - Real-time polymerase chain reaction

SNC - Sistema Nervoso Central

TH - Tirosina Hidroxilase

UNICEF - United Nations Children's Fund

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Desnutrição e Desenvolvimento Cerebral.....	17
2.2 Dopamina.....	20
2.2.1 Receptores Dopaminérgicos.....	24
2.3 Sistema de Recompensa Cerebral.....	26
2.4 Artigo de Revisão.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Animais.....	46
3.2 Obtenção dos Grupos Experimentais.....	47
3.3 Agonistas.....	47
3.4 Procedimentos Experimentais.....	48
3.4.1 Peso Corporal.....	48
3.4.2 Ingestão Alimentar.....	48
3.4.3 Avaliação da ingestão de alimento palatável sob estímulo dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 durante a idade adulta.....	49
3.4.4 Obtenção de amostras dos tecidos cerebrais.....	49
3.4.5 Procedimentos para PCR em tempo real.....	49
3.5 Análises Estatísticas.....	53
4 RESULTADOS.....	54
4.1 Artigo Original.....	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6 REFERÊNCIAS	79
7 ANEXOS.....	87

1 APRESENTAÇÃO

Apesar de a desnutrição mundial ter tido sua prevalência reduzida em todos os países, ainda constitui um agravante a saúde dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (BATISTA-FILHO E RISSIN, 2003). Além disso, tem sido foco de diversas pesquisas por ser um dos fatores associados ao excesso de peso e outras doenças crônicas que afligem globalmente a população mundial na vida adulta (LUCAS, 2000). O período perinatal em humanos constitui um período crítico, pois está relacionado ao desenvolvimento de vários sistemas, incluindo o sistema nervoso central. A falta ou excesso de nutrientes nesse período exerce impacto no desenvolvimento das estruturas e funções cerebrais (HALES e BARKER, 1991; MORGANE et al, 2002).

Diversas doenças ligadas ao desenvolvimento neural podem estar relacionadas a agravos, como a desnutrição, durante o período intrauterino (DAUNCEY e BICKNELL, 1999), predispondo a doenças, como obesidade, hipertensão e diabetes, na idade adulta (SILVEIRA et al, 2008), sendo a obesidade considerada uma grande ameaça para a saúde pública no mundo atual (CONWAY e RENE, 2004).

Estudos mostraram que várias regiões do cérebro são bastante afetadas pela desnutrição proteica precoce, como por exemplo, o cerebelo e o sistema hipocampal. Podem ocorrer alterações no nível de neurotransmissores e o número e a afinidade de alguns receptores dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico, gabaérgico e o colinérgico (MORGANE et al,1993; ALMEIDA, 1996).

Pesquisas indicam relações entre o consumo de alimentos e a liberação de neurotransmissores em estruturas do sistema nervoso central. A dopamina é um dos neurotransmissores clássicos que atua no sistema nervoso central e os receptores dopaminérgicos D1 e D2 são conhecidos por estarem envolvidos no comportamento alimentar. Esses receptores estão relacionados às sensações motivacionais causadas por certos

tipos de alimentos, estimulando a preferência e o consumo de alimentos energéticos (VUCETIC; REYES, 2010; BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

Pesquisadores analisaram os efeitos dos agonistas dopaminérgicos no comportamento alimentar de ratos submetidos à privação de alimento e revelaram uma importante característica farmacológica, onde cada tipo de receptor parece mediar diferentes efeitos na preferência de alimentos ricos em gordura e açúcar. Os resultados mostram que a liberação da dopamina no núcleo accumbens está associada com a ingestão de alimentos, principalmente os palatáveis, como chocolate e biscoitos (HAJNAL; NORGREN, 2001; HAJNAL et al, 2004; COOPER e NASER, 2006; LUTTER; ERIC, 2009).

Trabalhos experimentais vêm sendo realizados para verificar alterações no SNC e suas consequências sobre o comportamento alimentar, entretanto ainda continua escasso o número de pesquisas relacionadas com animais submetidos a desnutrição proteica no período perinatal. A realização de mais pesquisas neste sentido pode auxiliar na compreensão do surgimento de várias enfermidades, como a obesidade nos seres humanos.

Sendo assim, a fim de responder a hipótese de que a desnutrição proteica perinatal altera a expressão gênica de receptores dopaminérgicos D1 e D2 no núcleo accumbens e estriado e estimula o consumo de alimentos palatáveis em ratos adultos, o presente trabalho analisou através de técnica molecular por PCR em tempo real, o efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica de receptores dopaminérgicos D1 e D2 no núcleo accumbens e estriado em ratos adultos.

Os resultados deste trabalho podem auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares acerca do controle dopaminérgico sobre o comportamento alimentar e contribuir na compreensão do surgimento de várias enfermidades, como a obesidade nos seres humanos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desnutrição e Desenvolvimento Cerebral

A desnutrição, conforme definição da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000) é uma condição patológica causada por ingestão deficiente ou inadequada de calorias e/ou proteínas. A desnutrição protéico-calórica é, ainda hoje, uma causa significativa de mortalidade infantil no Brasil, e os fatores de risco mais associados a este quadro, no nosso meio, são a ausência de cuidados perinatais e o baixo peso ao nascer (GIUGLIANI et al, 1987). No mundo muitas crianças são afetadas pela desnutrição, que junto com outras epidemias como a malária, por exemplo, é responsável pelo alto número de mortalidade infantil (UNICEF, 2007).

O quanto a desnutrição precoce pode alterar o desenvolvimento do sistema nervoso central e qual a sua influência no prognóstico neurológico, tem sido uma questão bastante discutida em estudos experimentais envolvendo modelos animais (NUNES, 2001).

A desnutrição precoce constitui fator ambiental capaz de produzir alterações no cérebro. Estas alterações podem afetar aspectos morfológicos, neuroquímicos, neurofisiológicos e funcionais durante o desenvolvimento do cérebro (FUKUDA et al, 2002; HUANG et al, 2003; HOFFMANN et al, 2004; AKMAN et al, 2004)

Dentre os inúmeros modelos experimentais de desnutrição um dos mais utilizados é o de desnutrição proteica, que pode ocorrer no período pré-natal, pós-natal ou em ambos. A desnutrição proteica pré-natal leva à alteração do desenvolvimento pós-natal do cérebro, apesar de reabilitação nutricional ao nascimento (CINTRA et al, 1997; KEHOE, 2001; DURAN et al, 2006). A alteração no comportamento, na anatomia, na química e na fisiologia estende-se após o período pós-natal, continuando até a vida adulta (FIACCO et al, 2003; BOHRER, 2007). A desnutrição proteica pós-natal ocorrida durante o período do

desenvolvimento do SNC é extremamente prejudicial e ocasiona efeitos irreversíveis (DE OLIVEIRA e ALMEIDA, 1993; MORGANE et al, 2002; SILVA e DE OLIVEIRA, 2005).

As proteínas são formadas por agrupamentos de aminoácidos resultantes da ingestão de dietas e são necessárias para as funções neurológicas, motoras e funcionais do sistema nervoso central do ser humano. Assim, os déficits de proteína podem afetar diretamente o desenvolvimento cerebral (LIMA et al, 1993; MORGANE et al, 2002). Em ratos, o déficit na ingestão de proteína durante o período de gestação pode resultar em atrasos no desenvolvimento físico e cerebral. (SANTUCCI et al, 1994; ALMEIDA et al, 1996; CINTRA et al, 1997; MORGANE et al, 2002).

O conceito relativo ao impacto do agravo precoce ao cérebro está baseado na concepção de que há períodos do desenvolvimento durante os quais o organismo é particularmente vulnerável. Este denominado período crítico representa uma única janela de desenvolvimento, que não pode ser revertida ou repetida em um período posterior (MORGANE et al, 2002).

Tem sido descrito períodos críticos do desenvolvimento cerebral durante a gestação e logo após o nascimento, nos quais o cérebro é mais sensível a estímulos ambientais (TEJEDOR-REAL et al, 1998). Em ratos, o período que consiste no pico do desenvolvimento do sistema nervoso central é entre os 7 e 14 dias de vida, perdurando até os 35 dias. Durante este período estão ocorrendo fenômenos como neurogênese, gliogênese e pico de mielinização, em diferentes regiões do cérebro. Atraso em apenas poucos eventos neurológicos isolados, resultantes da desnutrição nesse período crítico do desenvolvimento, podem ser causas de reação em cadeia, amplificando erros funcionais (LEVITSKY e BARNES, 1972; MORGANE et al, 1992) e as interferências temporais na progressão dos processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos durante o desenvolvimento do SNC podem levar a déficit funcional permanente (MORGANE et al, 2002).

Alterações ambientais neste período, como as nutricionais, podem promover adaptações morfológicas e funcionais de estruturas envolvidas diretamente com o controle do comportamento alimentar (MUHLHAUSLER et al, 2006; DELAHAYE et al, 2008; GARCIA et al, 2010).

Existe uma estreita relação entre agressões ocorridas nas fases precoce do desenvolvimento e o surgimento de doenças metabólicas na vida adulta (GODFREY, BARKER 2000; BREIER et al, 2001). Apesar dos mecanismos ainda não terem sido totalmente elucidados, esse fenômeno é considerado uma mudança irreversível na trajetória do desenvolvimento (DOBBING, 1964; SILVEIRA et al, 2008).

No contexto dos estudos experimentais, a manipulação neonatal consiste em um modelo adequado de intervenção ambiental precoce para avaliar seu impacto sobre os diferentes desfechos comportamentais e endócrino-metabólicos na idade adulta. Assim, o desenvolvimento e a gravidade de diversas condições patológicas na vida adulta dependem da exposição a fatores ambientais precoces, da vulnerabilidade genética do indivíduo, assim como do período de ocorrência do evento estressor (CHARMANDARI et al, 2003). Uma vez que a vida pré-natal e a infância são períodos críticos caracterizados por alta plasticidade neuronal (KHAZIPOV, LUHMANN, 2006; CREWS et al, 2007), a exposição do indivíduo a um estímulo nesses períodos pode levar a alterações persistentes no funcionamento do organismo.

Estudos recentes têm demonstrado que a manipulação neonatal determina alterações persistentes no comportamento alimentar de ratos adultos. Animais manipulados consomem mais alimentos palatáveis (SILVEIRA et al, 2004; DA SILVA BENETTI et al, 2007) em comparação com animais não-manipulados nos primeiros dias de vida. Mais recentemente, foi descrito que a manipulação neonatal reduz o metabolismo dopaminérgico e a taxa de renovação (turnover) da serotonina no núcleo acumbens de animais adultos (SILVEIRA et al,

2010). Níveis diminuídos de grelina no plasma (SILVEIRA et al, 2006), redução nos receptores de dopamina D3 no núcleo accumbens (BRAKE et al, 2004), assim como aumento nos níveis de opióides em diferentes regiões cerebrais (PLOJ et al, 2003) foram identificados em animais manipulados.

2.2 Dopamina

A Dopamina é uma amina biogênica que faz parte do grupo das catecolaminas, que por sua vez se caracterizam, do ponto de vista químico, por apresentar na sua estrutura um grupo catecol (anel benzênico com dois grupos hidroxila proximais), ao qual se acopla uma amina em cadeia lateral. Além da dopamina, outras duas catecolaminas também atuam como neurotransmissores: a noradrenalina e a adrenalina (JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994).

A dopamina é a principal catecolamina no SNC e está envolvida em uma variedade de funções, tais como atividade motora, humor, emoção, afetividade e regulação neuroendócrina. As catecolaminas atuam como mensageiros químicos no SNC (VALLONE et al, 2000). No sistema nervoso periférico, a dopamina é um modulador das funções cardíaca e renal, do tônus vascular e da motilidade gastrointestinal (JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994).

Estudos sobre a transmissão dopaminérgica surgiram na década de 50, quando a dopamina foi reconhecida como um neurotransmissor independente (CARLSSON et al, 1958). A partir da técnica de microscopia de fluorescência, Carlsson e Waldeck (1958) observaram populações de neurônios contendo dopamina. Posteriormente, outros pesquisadores descreveram mais detalhes sobre o sistema dopaminérgico no sistema nervoso de ratos (DAHLSTROM e FUXE, 1964).

Evidências da literatura descrevem que o consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura provoca modificações neuroquímicas em sistemas neurotransmissores como o mesolímbico, envolvido no comportamento alimentar e na recompensa (LEVINE et al, 2003). Por exemplo, o consumo de alimento palatável induz a ativação do sistema de recompensa (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005), e se observa que ratos expostos ao alimento doce exibem uma maior resposta dopaminérgica, medida pela liberação aumentada de dopamina no núcleo acumbens e no córtex pré-frontal medial (GAMBARANA et al, 2003).

No SNC de ratos existe um número importante de células dopaminérgicas, cerca de 15.000 a 20.000 para cada uma das metades do mesencéfalo (HOKFELT et al, 1976). O sistema dopaminérgico tem sido amplamente estudado com o auxílio das técnicas de microscopia de fluorescência e imunocitoquímica. Diferentemente de outros neurotransmissores, como a noradrenalina, que é encontrada de forma difusa no SNC, a dopamina se distribui de maneira circunscrita. As projeções dopaminérgicas do SNC estão presentes no corpo estriado, córtex frontal, substância negra, sistema límbico, corpo amigdalóide e hipotálamo (HOKFELT et al, 1976; FALLON et al, 1978; FALLON e MOORE, 1978).

A dopamina é sintetizada no citosol dos terminais neuronais dopaminérgicos, em uma sequência de duas reações a partir do aminoácido tirosina, cuja biossíntese (Figura 1) inicia-se com o aminoácido tirosina, o qual é proveniente da alimentação e da hidroxilação hepática da fenilalanina pela fenilalanina hidroxilase. A primeira reação é limitante na síntese do neurotransmissor. Consiste na hidroxilação do anel aromático do aminoácido, catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), formando o precursor L-DOPA e requer a coenzima tetra-hidrobiopterina. A segunda reação é catalisada pela enzima aminoácido aromático decarboxilase e remove o grupo carboxil da L-DOPA, produzindo dopamina que finaliza a síntese (BEN-JONATHAN, 2001; SIEGEL et al, 2005).

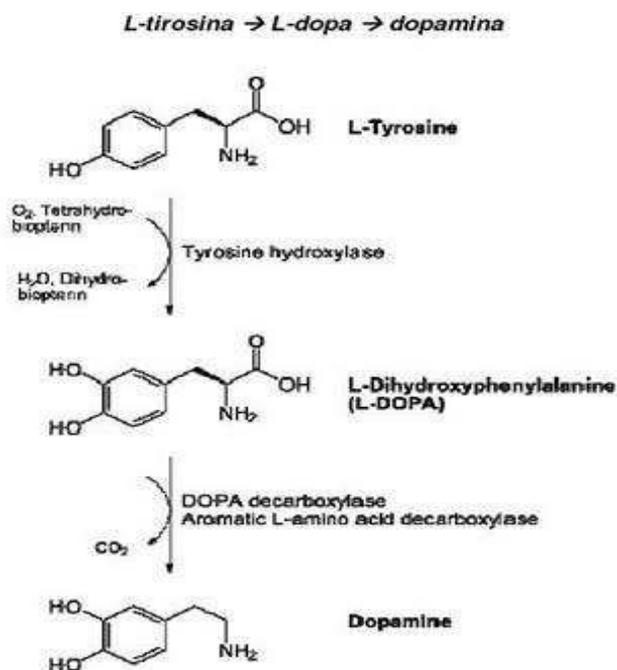


Figura 1 – Síntese da dopamina

A primeira etapa na síntese de DA consiste na conversão da tirosina em L-DOPA (1-3,4- diidroxifenilalanina ou levodopa) por oxidação da posição 3 no anel de benzeno. A próxima e última etapa na síntese de DA consiste na conversão da L-DOPA em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC). A AADC cliva o grupo carboxila do carbono da cadeia lateral de etilamina, liberando dióxido de carbono. Nos neurônios dopaminérgicos, o produto final da via de síntese das catecolaminas é a dopamina.

(Fonte: http://www2.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qpn1/proj/dopamina/s%C3%ADntese_da_dopamina.htm)

Trabalhos demonstraram que a hidroxilação do aminoácido L-tirosina é o ponto de regulação da síntese de catecolaminas no SNC e, conseqüentemente, a enzima tirosina é a enzima limitante da síntese de dopamina, noradrenalina e adrenalina e está presente predominantemente no citosol das terminações catecolaminérgicas. A enzima é uma oxidase que utiliza L-tirosina e oxigênio como substratos e tetra-hidro-biopterina (BH₄) como co-fator para adicionar um grupo hidroxila ao aminoácido e assim formar a L-DOPA. Na presença da descarboxilase de aminoácidos aromáticos a L-DOPA é convertida em dopamina. (NAGATSU et al, 1964; LEVIIT et al,1965).

Uma vez sintetizada, a dopamina é armazenada em vesículas sinápticas e sua entrada acontece por um processo ativo, dependente de ATP e do gradiente de pH estabelecido por uma proteína presente nessas vesículas onde permanece neste local para estoque, secreção e proteção contra a inativação enzimática até ser liberada por um mecanismo exocitótico dependente de cálcio quando um potencial de ação alcança o terminal sináptico. A dopamina pode então difundir-se e interagir com receptores tanto pré quanto pós-sinápticos. Esta interação estimula uma cascata de efeitos via um sistema de segundos mensageiros, o que resulta em diversas mudanças incluindo a ativação de canais iônicos e indução de fatores de transcrição (STONE, 1996; BEN-JONATHAN, 2001; ESTEVINHO, 2003).

Uma vez liberada na fenda sináptica, as ações podem ser finalizadas por recaptação ou transporte da dopamina para dentro do terminal pré-sináptico do qual havia sido liberada e por degradação enzimática ou difusão para fora da fenda sináptica (SANTIAGO et al, 1996).

A recaptação de dopamina é realizada diretamente através do transporte desta substância para dentro do terminal juntamente com Na⁺ e Cl⁻, através da membrana pré-sináptica via um transportador de membrana. Este transportador de dopamina (DAT) é uma glicoproteína de 58-77 KDa com 12 domínios transmembrana, um grande “loop” extracelular e com as porções N e C terminais no lado citosólico (McELVAIN e SCHENK, 1992).

Recentemente tem sido descrito que o DAT também parece estar envolvido na liberação de dopamina citoplasmática combinada com uma redistribuição deste transmissor entre o estoque vesicular e citoplasmático. Esta liberação da dopamina através do DAT ocorre de forma independente de potencial de ação (PIERCE e KALIVAS, 1997).

As enzimas responsáveis pelo catabolismo da dopamina são a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metiltransferase (COMT), que se distinguem inicialmente por sua localização. Assim, enquanto a MAO é uma enzima localizada na membrana externa das mitocôndrias e, portanto, intraneuronal, a COMT é uma enzima extraneuronal que atua

fundamentalmente na fenda sináptica. Esta localização distinta de ambas enzimas gera ainda outra importante diferença dado que a COMT age diretamente sobre a dopamina que é liberada no espaço sináptico e a MAO age sobre a dopamina que é recaptada antes que esta volte a ser reutilizada. A COMT transforma a dopamina liberada em 3- metoxitiramina (3-MT) que, por ação da MAO é convertida no produto final da dopamina, o ácido homovanílico (BEN-JONATHAN, 2001; ESTEVINHO, 2003).

2.2.1 Receptores Dopaminérgicos

Técnicas modernas de biologia molecular permitiram conhecer, até o presente momento, cinco tipos de receptores dopaminérgicos: D1, D2, D3, D4 e D5. Esses receptores estão organizados em dois grupos: o grupo D1 ou D1-like e o grupo D2 ou D2-like. O grupo D1 está representado pelos receptores D1 e D5; o grupo D2, pelos receptores D2, D3 e D4. A definição desses dois grupos está baseada na ligação com os mecanismos de transdução. Os pertencentes ao grupo D1 estimulam a enzima adenilato ciclase e aumentam o nível intracelular de AMP cíclico enquanto os do grupo D2 inibem essa enzima e diminuem o AMP cíclico intracelular (SIBLEY, 1992; JENNER, 1995; WOLTERS, 1996; WATTS, 1997).

Os genes dos receptores D1 e D5 não contêm introns, enquanto os genes que codificam os receptores D2, D3 e D4 apresentam seis, cinco e três íntrons, respectivamente. A presença de íntrons permite a geração de variantes do receptor por splicing alternativo. Todos os DR2-like apresentam variantes, no entanto, até o momento, somente para o receptor D2, foram identificadas isoformas com significado biológico reconhecido. O receptor D2 apresenta duas variantes, denominadas curta (D2 short - D2S) e longa (D2 long - D2L), que são geradas por splicing alternativo, com a inserção de 29 aminoácidos na terceira alça intracitoplasmática (BEN-JONATHAN, 2001).

Os receptores do tipo D1 são os mais abundantes no SNC e são amplamente expressos nos núcleos da base (putamen, caudado, accumbens), tubérculo olfatório, seguidos pelo córtex cerebral, hipotálamo e tálamo. Estes sítios estão envolvidos no controle da execução de movimentos, no controle da fala e na regulação da memória (TARAZI, 2001).

Os receptores do tipo D2 foram os primeiros a serem clonados, e podem ser encontrados nos núcleos accumbens, putamen e caudado, trato olfatório, substância negra (parte compacta) e área tegmental ventral. Também são encontrados em hipófise, retina, rim e sistema vascular. Dados recentes mostram que a exposição crônica a dietas ricas em gordura altera a expressão gênica de receptores de dopamina D2 no estriado e D4 no núcleo ventromedial do hipotálamo, assim como aumenta a expressão de tirosina hidroxilase (essencial para a produção de dopamina) na área tegmental ventral (HUANG et al, 2005; LI et al, 2009).

O receptor D2 existe sob duas isoformas e estão envolvidos com muitos dos efeitos que a dopamina exerce no SNC e periférico. (GUIVARC'H, MISSALE; BUNZOW, 1998; VALLONE, 2000; TARAZI, 2001).

Os receptores D3 estão distribuídos na região subcortical límbica e, em menores proporções, nos núcleos da base. O RNAm deste receptor foi detectado no cerebelo e parece estar envolvido na regulação dos movimentos oculares. O receptor D3 também tem sido descrito como um inibidor da adenilciclase, mas o faz menos eficazmente do que o receptor D2 (MISSALE, 1998; TARAZI, 2001).

O receptor D4 é expresso no córtex frontal, amígdala, bulbo olfatório, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo. A expressão do RNAm do receptor D5 foi observada no hipocampo e núcleos talâmicos que sabidamente estão envolvidos com a percepção dolorosa. Estes dados sugerem que os receptores D5 possam estar envolvidos no processo talâmico do estímulo doloroso (GRANDY, 1991; JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994).

Algumas estruturas onde estão expressos os receptores dopaminérgicos, juntas, formam o que é chamado de sistema de recompensa (LENARD, 2008), nela o cérebro gera sensação de prazer, motivação e aprendizado (BERRIDGE e KRINGELBACH, 2008).

2.3 Sistema de Recompensa Cerebral

O conhecimento e a descrição dos peptídeos cerebrais como neurotransmissores abriram caminhos para o surgimento de investigações sobre os efeitos do consumo de alimentos e do uso de drogas sobre o sistema dopaminérgico (HOEBEL, 1985). Além dos efeitos neuroquímicos, outra semelhança relevante com as drogas é que os alimentos palatáveis também são descritos por causarem dependência, especialmente quando consumidos em excesso (COLANTUONI et al, 2002). Sugere-se que o alimento doce possui uma capacidade potencial de causar dependência por estimular a liberação de dopamina e opióides no núcleo acumbens (AVENA et al, 2008).

Pesquisas revelaram que a sensação de recompensa está ligada a um complexo sistema "em cascata" (Figura 2), de excitação ou inibição entre estímulos complexos e as respostas complexas, envolvendo diversas estruturas situadas na profundidade do encéfalo e vários neurotransmissores, e que o resultado final do processo consiste na ativação de uma via dopaminérgica mesolímbica, que começa na área tegmental ventral e termina em receptores de dopamina denominados D2, localizados nas membranas de neurônios situados no núcleo accumbens e no hipocampo, levando a uma sensação de bem estar, a recompensa final (CLONINGER 1983; STEIN e BELLUZI 1986; BLUM e KOSLOWSKI, 1990).

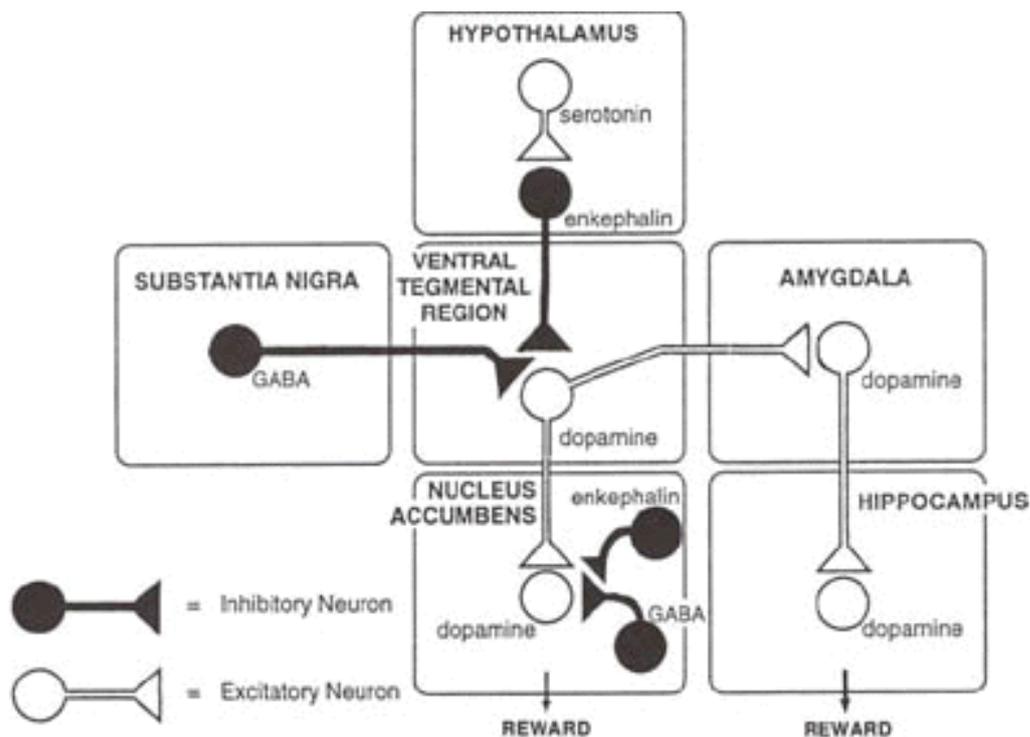


Figura 2 – Cascata de Recompensa do sistema límbico (Adaptado de Blum K et al, 1996).

Ativação de uma via mesolímbica dopaminérgica, que começa na área tegmental ventral e termina em receptores de dopamina denominados D2, localizados nas membranas de neurônios situados no núcleo accumbens e no hipocampo. A ativação do receptor de dopamina D2 pela dopamina nas membranas celulares dos neurônios no núcleo accumbens e no hipocampo é reconhecida como a "via final comum" da cascata da recompensa.

O processo, tal como idealizado por Blum (1996), se inicia no hipotálamo, com a atividade excitatória de neurônios serotoninérgicos. Isto leva à liberação do peptídeo opioide meta-encefalina na área tegmental ventral, o qual inibe a ação inibitória do GABA sobre os neurônios secretores de dopamina. Desinibidas, as células dopaminérgicas "disparam" no feixe mesolímbico e a dopamina termina por se acoplar com seus receptores D2, no hipocampo (via amígdala) e no núcleo accumbens onde, mais uma vez, a encefalina neutraliza a ação inibitória do GABA. Promove-se, assim, a despolarização dos neurônios dopaminérgicos (pós-sinápticos) nestas duas áreas, o que completa a "cascata" e gera a sensação de recompensa. Usualmente, estando íntegras as estruturas do sistema "em cascata" e os neurotransmissores envolvidos funcionando normalmente, a "recompensa" expressa em

sua forma mais significativa: sensação de bem-estar é obtida se certas condições básicas são satisfeitas (BLUM, 1990).

Estudos de neuroimagem em humanos demonstram liberação de dopamina no núcleo accumbens (NESTLER, 2001) e ativação de regiões específicas do cérebro, relacionadas ao prazer, ao consumir alimentos ricos em açúcar (SMALL et al, 2001). Esses dados deixam claro que o sistema dopaminérgico abrange os neurônios da área tegmental ventral, bem como suas projeções para o corpo estriado, amígdala, córtex pré-frontal, e outras regiões, mediando o incentivo ao consumo de alimentos e outros tipos de recompensas, (KELLEY e BERRIDGE, 2002; NESTLER, 2005; FIGLEWICZ e BENOIT, 2009; FIGLEWICZ, 2010) como sexo e recompensas artificiais como o consumo de drogas (HAO et al, 2004).

2.4 Artigo de Revisão - Aceito para publicação pela Revista Neurobiologia – (Anexos)

EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA INGESTÃO ALIMENTAR – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

GENE EXPRESSION OF DOPAMINE RECEPTORS INVOLVED IN FOOD INTAKE – A SYSTEMATIC REVIEW

Gilvanildo Roberto da Silva¹, Sandra Lopes de Souza², Manuela Figueiroa Lyra de Freitas³.

¹Enfermeiro, Mestrando em Patologia - UFPE

²Nutricionista, Pós Doutorado em Neurociências, Professora Adjunta Depto de Anatomia - UFPE

³Médica Veterinária, Doutorado em Nutrição, Professora Adjunta Depto de Anatomia - UFPE

RESUMO

Objetivo: Revisar de forma sistemática artigos relacionados à expressão gênica dos receptores dopaminérgicos em áreas do cérebro, envolvidas com o comportamento alimentar em ratos. **Método:** A revisão sistemática da literatura foi realizada no período de novembro de 2011 a Abril de 2012 com busca de artigos nas bases de dados: MEDLINE OLD, MEDLINE, LILACS, SciELO. Foram excluídos artigos de revisão da literatura, dissertações, teses, estudos de casos, bem como aqueles não relacionados com o comportamento alimentar. Foram incluídos trabalhos com experimentação animal, especificamente em ratos, artigos originais sem limite de período de publicação, e aqueles que utilizam a técnica PCR em tempo real para análise da expressão gênica dos receptores dopaminérgicos. **Resultados:** Inicialmente foram encontrados 246 trabalhos na base MEDLINE via PUBMED, um trabalho no LILACS e nenhum no SCIELO. Destes foram selecionados nove artigos. **Conclusão:** Os resultados da maioria dos artigos selecionados, sugerem redução da expressão gênica dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, sobretudo no núcleo accumbens (NAcc), quando os animais são expostos principalmente às dietas palatáveis e aumento da expressão de ambos receptores (D1 e D2) em animais com déficit nutricional, além de um aumento da expressão de D1 e redução de D2 no hipotálamo de animais obesos.

Palavras chaves: comportamento alimentar, receptores dopaminérgicos, PCR em tempo real

ABSTRACT

Objective: To systematic review articles that expression of dopamine receptors genes in brain areas involved in feeding behavior in rats. **Method:** The systematic literature review was conducted between November 2011 to April 2012 to search for articles in databases: OLD MEDLINE, MEDLINE, LILACS, SciELO. We excluded review articles in the literature, dissertations, theses, case studies, as well as those who are not related to eating behavior. We included studies with animal experimentation, especially in rats, original articles without limit of time of publication, and those using the RT-PCR technique for analyses of the gene expression of dopamine receptors. **Results:** Initially 246 jobs were found in MEDLINE via PubMed, LILACS and a work in any SCIELO. Of these nine articles were selected. **Conclusion:** The results of most of the articles suggest reduced gene expression of D1 and D2 dopamine receptors, especially in the nucleus accumbens (NAcc), when

animals are exposed mainly to palatable diets and increased expression of both receptors (D1 and D2) in animals nutritional deficiency in addition to an increased expression of D1 and D2 reduction in the hypothalamus of the obese animals.

keywords: feeding behavior, receptors dopamine, real-time pcr

INTRODUÇÃO

O interesse na determinação da extensão dos agravos nutricionais intensificou-se nos últimos anos, já que prevalência da desnutrição permanece elevada em muito países subdesenvolvidos ao mesmo tempo em que a obesidade tem sido considerada atualmente como a mais importante desordem nutricional do mundo desenvolvido, configurando-se como uma grande ameaça à saúde pública mundial^{4,31}. Um aspecto a se considerar refere-se às tendências concomitantes de declínio da desnutrição e de ascensão da obesidade, observadas em sociedades em desenvolvimento que experimentam rápidas e intensas transformações em seu padrão de crescimento econômico e estrutura demográfica, fenômeno que caracteriza a denominada “transição nutricional”^{41,42}.

A dopamina trata-se de um neurotransmissor importante no sistema de recompensa ou centro do prazer, que está localizado no sistema cortico-mesolímbico. O consumo de determinados alimentos, pode ocasionar mudanças na liberação da dopamina e influenciar o comportamento da espécie estudada^{22,38,12,13}.

Acredita-se que a liberação da dopamina no núcleo accumbens está associada com a ingestão de alimentos, principalmente os palatáveis, como chocolate e biscoitos^{16,17,30}.

Pesquisadores analisaram os efeitos dos agonistas dopaminérgicos no comportamento alimentar de ratos submetidos à privação de alimento e revelaram uma importante característica farmacológica, onde cada tipo de receptor dopaminérgico parece mediar diferentes efeitos na preferência de alimentos ricos em gordura e açúcar⁷.

É consenso na literatura que os receptores dopaminérgicos D1 e D2, são conhecidos por estarem envolvidos com o comportamento alimentar^{2,11,15,27,28,39,44,48,49}.

Além disso, o sistema dopaminérgico e seus receptores estão associados com a ocorrência de vários tipos de doenças que acometem os indivíduos, como: Esquizofrenia³, Doença de Alzheimer²⁶, Doença de Parkinson⁵, Obesidade^{47,32}, Hipertensão⁵¹ e Diabetes¹⁹.

Diversas funções relacionadas à atividade motora, mecanismo de atenção, emoção, memória, aprendizagem, recompensa e vício, podem ser moduladas pelos receptores dopaminérgicos^{46,50,18}.

Várias etapas no processo de expressão gênica podem ser moduladas, e essa regulação permite à célula o controle sobre sua estrutura e função, sendo base para a diferenciação celular, morfogênese, versatilidade e adaptabilidade de qualquer organismo²⁰.

Dessa maneira, a análise da expressão gênica de receptores dopaminérgicos em diferentes tipos de tecido de organismos em estado normal ou patológico, é fundamental para as pesquisas biológicas, pois podem subsidiar novas abordagens terapêuticas no tratamento de doenças, além de ser uma importante ferramenta dos mecanismos ligados à alterações nutricionais e o sistema de neurotransmissão dopaminérgica.

Tendo em vista os poucos estudos que abordam esse tema, o presente artigo tem como objetivo revisar de forma sistemática os artigos que envolvem a expressão gênica de receptores dopaminérgicos D1 e D2 em áreas do cérebro, envolvidas com o comportamento alimentar em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

A revisão sistemática da literatura foi realizada no período de novembro de 2011 a Abril de 2012 a partir das bases de dados MEDLINE (1966-2010), MEDLINE OLD (1966-1996), LILACS e SciELO. Não foi considerado nenhum limite em relação ao período de publicação, sendo os artigos selecionados posteriormente por critérios de inclusão e exclusão. As referências bibliográficas dos artigos selecionados também foram consultadas em busca de outros artigos relacionado ao tema. Para a pesquisa foram utilizados descritores DeCS e MeSH – palavras chaves para recuperação de assuntos da literatura científica e termos livres (TL) - termos não encontrados no DeCS e MeSH, mas de relevância para a pesquisa, sendo realizados os seguintes cruzamentos: “real-time pcr” (MeSH) AND “receptors, dopamine” (MeSH); “real-time pcr” (MeSH) AND “feeding behavior” (MeSH); “Feeding behavior” (MeSH) AND “receptors, dopamine” (MeSH); “Feeding behavior” (DeCS) AND “receptors, dopamine” (DeCS); “gene expression” (TL) AND “receptors dopamine” (DeCS); “gene expression” (TL) AND “feeding behavior” (MeSH), e seus equivalentes em português e espanhol. A seleção dos artigos foi realizada a partir de critérios de inclusão, os quais foram: artigos originais (excluindo-se editoriais e estudo de caso), sem limite de período de publicação; pesquisas com experimentação em animais, especificamente, em ratos e trabalhos que relacionassem a determinação gênica de receptores dopaminérgicos por RT-PCR em áreas envolvidas com o comportamento alimentar, tendo os manuscritos sido publicados nos idiomas português, inglês e espanhol. Os artigos de revisão da literatura, dissertações e teses

foram excluídos, bem como aqueles que não utilizaram a RT-PCR como método de análise molecular da expressão gênica dos receptores dopaminérgicos e os que não utilizaram o rato como modelo animal nos experimentos.

RESULTADOS

Para os estudos que analisaram a expressão gênica de receptores dopaminérgicos, usando a técnica PCR em tempo real como método de análise, foram encontrados 246 na base MEDLINE (1997-2010) e MEDLINE (1966-1996), um no LILACS e nenhum no SciELO – Brasil, totalizando 247 artigos.

Retiradas as referências cruzadas redundantes, constantes em mais de uma base e seguidos os critérios de exclusão e inclusão descritos no método, foram selecionados um total de nove artigos (Figura 1).

Na tabela 1 encontra-se uma síntese das variáveis analisadas nos artigos que foram selecionados para a revisão. Ao se analisar o país de publicação, observa-se que cinco dos artigos selecionados foram realizados na América do Norte^{44,11,48,2,49}, dois no Oriente médio, um na Europa^{27,28}, e outro na Oceania³⁹.

Todos os artigos selecionados realizaram estudos apenas com os receptores dopaminérgicos D1 e D2, apesar de este não ser um critério de inclusão/exclusão.

Os objetivos de todos os artigos selecionados estão relacionados com o comportamento alimentar, tipo de dieta e/ou algum transtorno nutricional e utilizam a técnica de análise molecular RT-PCR para expressão gênica dos receptores dopaminérgicos nas estruturas cerebrais^{44,11,27,28,48,15,2,39,49}.

Com relação ao tamanho total das amostras, o número de animais utilizados nos estudos varia entre doze¹¹ e sessenta². Dois estudos utilizam ratos albinos machos e fêmeas da linhagem Wistar^{2,39}, três utilizam machos da linhagem Sprague–Dawley^{27,28,2}, um estudo utilizou machos da linhagem Zucker¹¹, e outro utilizou machos da linhagem Ficher⁴⁴, três utilizaram camundongos machos e fêmeas^{48,15}. Quanto as estruturas cerebrais, o núcleo accumbens foi estudado em seis artigos^{27,48,15,2,39,49}, a área tegmentar ventral em seis artigos^{27,28,48,15,39,49} seguidos pelo hipotálamo, cinco artigos^{44,11,48,15,49}, o córtex pré frontal em quatro artigos^{27,28,48,49} o estriado em três^{27,28,15}, e o hipocampo, em dois artigos^{27,28}.

Na maioria dos estudos, há redução significativa na expressão gênica dos receptores dopaminérgicos D2, quando os animais são expostos principalmente às dietas palatáveis^{48,15,2,49}. Nos artigos em que os animais apresentam algum tipo de deficiência nutricional, ocorre

aumento da expressão gênica de ambos receptores D1 e D2^{44,27,28}, e nos artigos com animais obesos¹¹ ocorre aumento significativo da expressão dos receptores D1 e redução de D2 nas estruturas cerebrais estudadas.

DISCUSSÃO

A heterogeneidade do conteúdo dos artigos não permitiu a aplicação de tratamento estatístico (metanálise). Dentre as diferenças entre os estudos, ressalta-se a falta de padronização na maioria das variáveis analisadas principalmente a grande divergência em relação ao tamanho das amostras, dos objetivos e das diversas estruturas cerebrais analisadas.

A maioria dos estudos foram realizados nos Estados Unidos da América^{44,11,48,2,49}. Outro ponto relevante é a ausência de estudos na América Latina, sugerindo pouca ênfase em pesquisar este tema nessa região.

Pesquisas sobre as funções dos receptores dopaminérgicos sobre o comportamento alimentar e da sua relação sobre a regulação central do apetite parece ter se intensificado nos últimos anos. Acredita-se que esse fato possa estar relacionado a grande preocupação dos países desenvolvidos com o aumento da ocorrência da obesidade em suas populações, a mais importante desordem nutricional, sendo considerada como um grande problema de saúde pública^{4,31,13,30,48,11}.

A função normal da neurotransmissão dopaminérgica tem se mostrado indispensável para a alimentação e sobrevivência³⁹. Acredita-se que qualquer anormalidade envolvendo o sistema dopaminérgico será refletido por mudanças no comportamento alimentar³⁹.

Vários estudos têm demonstrado que os comportamentos motivados, induzido por alimentos altamente palatáveis são mediados pelo sistema dopaminérgico mesolímbico³⁰.

Os nove artigos utilizados nesta revisão, avaliaram os genes para os receptores dopaminérgicos D1 e D2 que são fortemente associados com a ingestão de alimentos⁴⁹.

Sato et al⁴⁴ desenvolveram estudo que objetivou determinar a expressão gênica de receptores dopaminérgicos D1 e D2 no hipotálamo de ratos portadores de anorexia relacionada ao tumor. Os resultados desse estudo mostraram que os genes dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 foram expressos abundantemente no hipotálamo de ratos com anorexia de tumor em comparação aos ratos normais sem tumor e com alimentação livre. Tal estudo fornece evidências de que os subtipos de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no hipotálamo estão envolvidos na regulação do tamanho e número de refeições e, portanto, na ingestão alimentar de ratos com anorexia relacionada ao tumor, e que, bloqueando-se os

efeitos da dopamina nos receptores D1 ocorre diminuição da ingestão alimentar e no tamanho das refeições, enquanto nos receptores D2 há um aumento do consumo alimentar através do aumento do número de refeições. De fato, parece ser consenso na literatura, que os receptores D1 e D2 quando são estimulados no hipotálamo, têm efeitos opostos. Os receptores D1 quando estimulados liberam adenilato ciclase⁴⁵, que por sua vez estimula a ingestão alimentar^{26,21}, já os receptores D2 ao serem estimulados inibem a liberação da adenilato ciclase^{45,8}, e como no hipotálamo os receptores D2 desempenham papel no processo de saciedade^{36,9}, postula-se que os altos níveis destes receptores expressos no hipotálamo, contribui para uma redução da ingestão alimentar associada ao padrão alimentar característico de ratos com anorexia de tumor.

A função normal da sinalização dopaminérgica está intimamente ligada ao nível de expressão de receptores dopaminérgicos⁴⁵. Diante disto, Fetissov e colaboradores¹¹, determinaram a expressão gênica dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no hipotálamo de ratos Zucker obesos e magros e testaram a hipótese de que as diferenças nos níveis de expressão dos receptores são relevantes para a hiperfagia em ratos obesos. Constataram que ratos obesos que consomem alimentos em grandes quantidades, numa frequência menor de vezes, apresentam alterações sobre os níveis da expressão gênica dos receptores dopaminérgicos no hipotálamo. Supõem que a diminuição dos níveis da expressão gênica dos receptores D2 encontrado no hipotálamo são relevantes para hiperfagia, e que as mudanças na expressão dos receptores dopaminérgicos no hipotálamo induz a comportamentos associados com aumento do consumo dos alimentos, o que, por sua vez, favorecem o desenvolvimento da obesidade¹¹.

No que diz respeito receptor D1, a liberação de dopamina é sincronizado entre o núcleo ventromedial do hipotálamo e a área lateral hipotalâmica²⁹, portanto um alto nível de receptores D1 no núcleo ventromedial do hipotálamo e um baixo nível na área lateral hipotalâmica dos ratos obesos podem, simultaneamente, acentuar e diminuir, respectivamente, o efeito da dopamina nestas duas áreas.

Estudo de Kuperstein e colaboradores²⁷ que avalia as consequências da deficiência de n-3 PUFA (ácidos graxos poli-insaturados), durante o período perinatal sobre a expressão gênica dopaminérgica, apresenta forte evidência de que tal deficiência imposta aos filhotes através da manipulação da dieta materna provoca aumento de expressão de genes que codificam os receptores dopaminérgicos D1 e D2.

É possível que esta alteração gênica dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 nos filhotes, esteja relacionada com a manipulação da dieta materna durante o período perinatal.

O período perinatal constitui o período crítico do desenvolvimento cerebral. A falta ou excesso de nutrientes poderá exercer profundo impacto no desenvolvimento das estruturas e funções cerebrais, bem como alterar o nível de neurotransmissores e o número e a afinidade de alguns receptores de vários sistemas de neurotransmissão, dentre os quais os receptores dopaminérgico^{37,1}.

Alguns estudos^{40,10} tem confirmado o papel da PUFA na regulação da transcrição de genes. Assim, parece que ratos cronicamente deficiente em n-3 PUFA apresentam funcionamento anormal nas regiões mesocorticais e mesolímbicas, que são as vias dopaminérgicas, e esta deficiência pode ser parcialmente revertida por suplementação⁶.

Noutro estudo, Kuperstein e colaboradores²⁹ investigaram se a dieta materna deficiente em n-3 LNA (ácido linolênico) iria alterar a expressão de componentes-chave da via de neurotransmissão dopaminérgica durante o período pós-natal. Os resultados fornecem evidências convincentes de que a dieta materna deficiente em n-3 LNA provoca um aumento significativo nos níveis de expressão dos receptores D1 e D2 no córtex pré-frontal e no corpo estriado de ratos no período pós-natal. O aumento dos níveis dos receptores D1 e D2 foi mais evidente após quatro semanas do período pós-natal, sugerindo o desenvolvimento de um mecanismo compensatório para regular e corrigir os baixos níveis de dopamina na fenda sináptica²⁷. Independentemente, a expressão elevada de ambos os receptores em várias regiões cerebrais pode ser atribuída a uma hipersensibilidade comportamental causada pela possível insuficiência na produção de dopamina²⁷. Esses dados corroboram com resultados de estudo recente, onde uma dieta com deficiência crônica de n-3 LNA provocou uma diminuição na ligação do receptor DRD2 em estruturas selecionadas do cérebro³³.

Vucetic e colaboradores⁴⁸ analisaram se o consumo da dieta materna com alto teor de gordura (HF) iria alterar a metilação do DNA globalmente ou dentro das regiões promotoras de genes relacionados a dopamina e opióides, Assim, foi constatado um aumento significativo da expressão do transportador de dopamina (DAT) no VTA, NAcc, e PFC, e uma diminuição da expressão do receptor D1, D2, no NAcc e PFC após o consumo da dieta hipercalórica.

Essas alterações parecem resultar um estado hipodopaminérgico, com aumento da recaptação da dopamina (via aumento da expressão do DAT e diminuição da sinalização através dos receptores)⁴⁴.

Sendo assim, acredita-se que o consumo materno de dieta com alto teor de gordura durante a gestação e lactação, pode programar o aumento de consumo de alimento palatável em paralelo com alterações na expressão gênica dos receptores dopaminérgicos dentro do circuito mesocorticolímbico e hipotálamo^{23,48}. Além disso, as alterações na expressão gênica

da dopamina no hipotálamo com aumento da tirosina hidroxilase (TH) e diminuição de DAT⁴⁸ fornecem evidências de que no hipotálamo, a dopamina desempenha papel importante no processo da regulação da ingestão alimentar^{14,24}.

Uma das principais preocupações no tratamento das desordens alimentares é a alta taxa de recidiva aos hábitos de ingestão anormal³⁴. Neste sentido, Garcia e colaboradores¹⁵ avaliaram a reintegração do comportamento de busca recidiva por alimentos palatáveis, induzida por estímulos anteriormente associado a esses tipos de alimentos, como a re-exposição e estresse. Além disso, examinaram mudanças na expressão gênica da dopamina no sistema mesolímbico e hipotálamo em diferentes fases das respostas operante.

Os resultados indicam que após a reintegração do comportamento de busca por alimentos palatáveis, ocorre uma diminuição da expressão gênica dos receptores D2 no estriado dorsal e no NAcc, e nenhuma alteração nos receptores D1.

Não está claro se a resposta dopaminérgica no NAcc a alimentos palatáveis resulta da suscetibilidade à obesidade. Nesse sentido, Alσιο e colaboradores² investigaram o efeito do acesso ampliado e irrestrito a dieta com alto teor de gordura e elevado teor de açúcar (HFHS) na expressão de genes que codificam os receptores de dopamina no NAcc de ratos propensos à obesidade (OP) e resistentes à obesidade (OR). Os resultados mostraram que o acesso restrito da dieta HFHS levou a diminuição da expressão gênica de receptores D1, bem como nos níveis de expressão de receptores D2 em relação ao grupo que foram alimentados com ração-controle/HFHS. Sendo assim, os autores concluem que a exposição a dietas HFHS altera os níveis da dopamina no NAcc, talvez modificando a motivação para procurar recompensa alimentar. O fato de ocorrerem mudanças na expressão gênica dos receptores D1 em animais propensos à obesidade após longo período de exposição a alimentos palatáveis e que este efeito se estende até a fase de descontinuação da recompensa, implica o receptor D1 na propensão a comer em excesso e, no efeito de ganho de peso, em indivíduos propensos a obesidade. Os autores do estudo sugerem que esse padrão de expressão gênica é produzido pelo consumo de alimentos HFHS e não por ingestão excessiva desta dieta ou pela obesidade relacionada a tal alimentação excessiva.

Embora as causas da obesidade sejam multifatoriais, a disponibilidade de junk-food (alimentos ricos em gordura e pobre em nutrientes), associado à redução da atividade física, tem exercido grande efeito sobre o aumento das taxas de obesidade nas últimas décadas³⁴. Neste contexto, Ong e Muhlhausler,³⁹ desenvolveram estudo afim de determinar o efeito de uma dieta materna junk-food sobre a expressão gênica de componentes das vias de recompensas do sistema mesolímbico nos filhotes em diferentes fases da vida pós-natal (6

semanas e 3 meses), mostrando distintas alterações moleculares dentro do sistema central de recompensa em machos e fêmeas. Os resultados indicam que não houve efeito significativo da dieta materna junk-food sobre a expressão gênica de TH e dos receptores D1 e D2 no NAcc e VTA nos filhotes de todos os grupos do estudo. Ocorreu diminuição da expressão de DAT e aumento da expressão de opióides, em 6 semanas, assim como diminuição da expressão do receptor opióide e o aumento de DAT aos 3 meses de idade. Este padrão de expressão do gene é consistente com a sensibilidade reduzida a opióides e do aumento da recaptação de dopamina no neurônio pré-sináptico, ambos indicam redução do sinal de opióides e dopamina³⁹. Da mesma forma, Vucetic e colaboradores⁴⁸ relatam que filhotes alimentados com dieta rica em gordura, apresentam baixa sinalização dopaminérgica, evidenciada pela expressão diminuída dos receptores D1 e D2 e pelo aumento da expressão de DAT em 6 meses de idade. Os autores concluem que estudos como estes, fornecem evidências de que a exposição a uma dieta com alto teor de gordura e/ou açúcar antes do nascimento pode aumentar a preferência por alimentos ricos em gordura nos filhotes após o nascimento, e estas preferências está associada com mudanças nas vias do sistema de recompensa central.

No mesmo sentido, estudo recente de Vucetic e colaboradores⁴⁹ buscaram investigar modificações epigenéticas e alterações na expressão de genes relacionados a dopamina em ratos com (DIO) obesidade induzida pela dieta. Os resultados indicaram que ocorreu redução da expressão dos receptores D1 no NAcc e PFC e redução e ambos receptores D1 e D2 no VTA. Nenhuma alteração do receptor D2 no PFC. A ingestão da dieta crônica de alto teor de gordura (HF) é conhecido por alterar sistemas cerebrais de neurotransmissores que participam na regulação central da ingestão alimentar. Sendo assim, os autores do estudo sugerem que o consumo de uma dieta crônica HF em ratos, está associada com alterações significativas na expressão do gene dopaminérgico, e que o padrão desta mudança difere, dependendo da região do cérebro, sendo importante identificar os mecanismos que liga a ingestão de dieta HF crônica a essas alterações⁴⁹.

CONCLUSÃO

Apesar da heterogeneidade dos métodos utilizados e da falta de padronização entre as variáveis das amostras, a maioria dos resultados dos artigos selecionados para esta revisão sistemática, sugerem uma redução da expressão gênica dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, sobretudo no NAcc, quando os animais são expostos principalmente às dietas palatáveis. Além disso, ocorre aumento da expressão de ambos receptores (D1 e D2) nos animais com

algum déficit nutricional e aumento da expressão de D1 e redução de D2 no hipotálamo de animais obesos.

Como o sistema dopaminérgico está criticamente envolvido no comportamento alimentar, se faz necessária a realização de estudos mais aprofundados, sobre a regulação dos receptores dopaminérgicos, com especial atenção para os receptores D1 e D2, que estão relacionados ao sistema de recompensa alimentar.

Abordagens futuras no sentido de encontrar mecanismos de ajuste e controle das funções dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, tornam-se necessárias para normalizar a neurotransmissão dopaminérgica no cérebro com o objetivo final do tratamento de comportamentos de dependência, incluindo a hiperfagia da obesidade.

REFERÊNCIAS

1. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and Reactivity to Drugs Acting in the Central Nervous System. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1996; 20: 389-402.
2. Alsjö J, Olszewski PK, Norbäck AH, Gunnarsson ZEA, Levine AS, Pickering C, Schiöth HB. Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience* 2010; 171: 779-87.
3. Anissa, ABID. Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D1 receptors tell us? *Research report* 2003; 3:166-71.
4. Bouchard C. *Atividade física e obesidade – Barueri: 1ª edição: Manole, 2003.469p*
5. Cardoso F, Teixeira AL, Camargos S, Maia DP. Importância dos Agonistas Dopaminérgicos nas Fases Inicial e Avançada da Doença de Parkinson. *Revista Neurociências* 2006; 14: 161-165.
6. Clarke SD, Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr* 1994; 14: 83–98.
7. Cooper SJ, Al-Naser HA. Dopaminergic control of food choice: Contrasting effects of SKF 38393 and quinpirole on high-palatability food preference in the rat. *Neuropharmacology*, 2006; 50: 953-963.
8. Curlewis JD, Thiery JC, Malpoux B. Effect of hypothalamic infusion of a dopamine D1 receptor antagonist on prolactin secretion in the ewe. *Brain Res* 1995; 697: 48-52.

9. Enjalbert A, Bockaert J. Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol Pharmacol* 1983; 23: 576-84.
10. Fetissov SO, Meguid MM, Chen C, Miyata G. Synchronized release of dopamine and serotonin in the medial and lateral hypothalamus of rats. *Neuroscience* 2000; 101: 657-63.
11. Fetissov SO, Meguid MM, Sato T, Zhang LH. Expression of dopaminergic receptors in the hypothalamus of lean and obese Zucker rats and food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: 905-10.
12. Figlewicz DP, Benoit SC. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2009; 296: 9-19.
13. Figlewicz DP, Sipols AJ. Energy regulatory signals and food reward. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2010; 97: 15-24.
14. Gainetdinov RR, Jones SR, Caron MG. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 303-311.
15. García E, M, Burokas A, Kostrzewa E, Gieryk A, Korostynski M, Ziolkowska B, Przewlocka B, Przewlocki R, Maldonado R. New operant model of reinstatement of food-seeking behavior in mice. *Psychopharmacology* 2010; 215:49-70.
16. Hajnal A, Norgren R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain research*, 2001; 904: 76-84.
17. Hajnal A, Smith GP, Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2004; 286: 31-37.
18. Hazelwood LA, Free RB, Cabrera DM, Skinbjerg M, Sibley DR. Reciprocal modulation of function between the D1 and D2 dopamine receptors and the Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 2008; 283: 36441-53.
19. Horst IC, Boer RA. Neurohormonal profile of patients with heart failure and diabetes. *Neth Heart J* 2010; 18: 190-6.
20. Kapczinski F, Frey BN, Zannatto V. Fisiopatologia do transtorno afetivo bipolar: o que mudou nos últimos 10 anos? *Rev. Bras. Psiquiatr* 2004; 26: (suppl.3) 17-21.

21. Keabedian JW, Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1979; 277: 93–6.
22. Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 2002; 22: 3306-11.
23. Kodas E, Vancassel S, Lejeune B, Guilloteau D, Chalon S. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *J. Lipid Res* 2002; 43: 1209–19.
24. Koob GF, Le MM. Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 2008; 59: 29–53.
25. Kumar U, Patel SC. Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer disease brain. *Brain Res* 2007; 1131: 187-196.
26. Kuo DY. Co-administration of dopamine D1 and D2 agonists additively decreases daily food intake, body weight and hypothalamic neuropeptide Y level in rats. *J Biomed Sci* 2002; 9: 126-32.
27. Kuperstein F, Yakubov E, Dinerman P, Gil S, Eylam R, Salem JN, Yavin E. Overexpression of dopamine receptor genes and their products in the postnatal rat brain following maternal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J Neurochem* 2005; 95: 1550.
28. Kuperstein F, Eylam R, Yavin E. Altered expression of key dopaminergic regulatory proteins in the postnatal brain following perinatal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J Neurochem*. 2008; Jul;106(2):662-71.
29. Leibowitz SF, Rossakis C. Pharmacological characterization of perifornical hypothalamic dopamine receptors mediating feeding inhibition in the rat. *Brain Res* 1979; 172: 115–130.
30. Lutter M, Eric J. Nestler. Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *The Journal of Nutrition* 2009; 139: 629-632.
31. Machado MFAS, Vieira NFC. Participação na perspectiva de mães de crianças desnutridas. *Revista Latino-Americana de Enfermagem* Ribeirão Preto 2004; 12: 76-82.
32. Mathes WF, Nehrenberg DL. Dopaminergic dysregulation in mice selectively bred for excessive exercise or obesity. *Behav Brain Res* 2010; 210: 155-63.

33. McNamara RK., Levant B. and Richtand NM. Omega-3 fatty acid deficiency decreases dopamine D₂ receptor binding and increases serotonin 5-HT_{2A} receptor binding in the adult rat prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry* 2006; 59, S146.
34. Meguid MM, Yang ZJ, Laviano A. Meal size and number: relationship to dopamine levels in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol* 1997; 272(6 Pt 2):1925–30.
35. Meguid MM, Fetissoff SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi FF. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* 2000; 16: 843–857.
36. Moore BJ, Gerardo GT, Horwitz BA, Stern JS. Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull* 1986; 17: 563-9.
37. Morgane PJ, Austin-Lafrance RJ. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 91-128.
38. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 119-28.
39. Ong ZY, Muhlhauser BS. Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *The FASEB Journal* 2011; 25: 2167–79.
40. Parada MA, Hernandez L, Hoebel BG. Sulpiride injections in the lateral hypothalamus induce feeding and drinking in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 30: 917–23.
41. Popkin BM. Nutrition patterns and transitions. *Popul Dev Rev* 1993; 19: 138-57.
42. Popkin BM. The nutrition transition in low income countries: an emergency crisis. *Nutr Rev* 1994; 52:285-98.
43. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr. Rev* 2004; 62: 333–9.
44. Sato T, Meguid MM, Fetissoff SO, Chen C, Zhang L. Hypothalamic dopaminergic receptor expressions in anorexia of tumor-bearing rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: 1907-16.
45. Szczypka MS, Rainey MA, Palmiter RD. Dopamine is required for hyperphagia in *Lep(ob/ob)* mice. *Nat Genet* 2000; 25 (1):102-104.

46. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 125-132.
47. Volkow ND, Wang G. Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: Possible contributing factors. *Neuroimage* 2008; 42: 1537-1543.
48. Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E, Reyes TM. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 2010; 151: 4756–64.
49. Vucetic Z, Carlin JL, Totoki K, Reyes TM. Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity. *J Neurochem.* 2012; Mar;120(6):891-8.
50. Zawilska JB. Dopamine receptors--structure, characterization and function. *Postepy Hig Med Dosw* 2003; 57: 293-322.
51. Zeng C, Armando I. Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: 551-569.

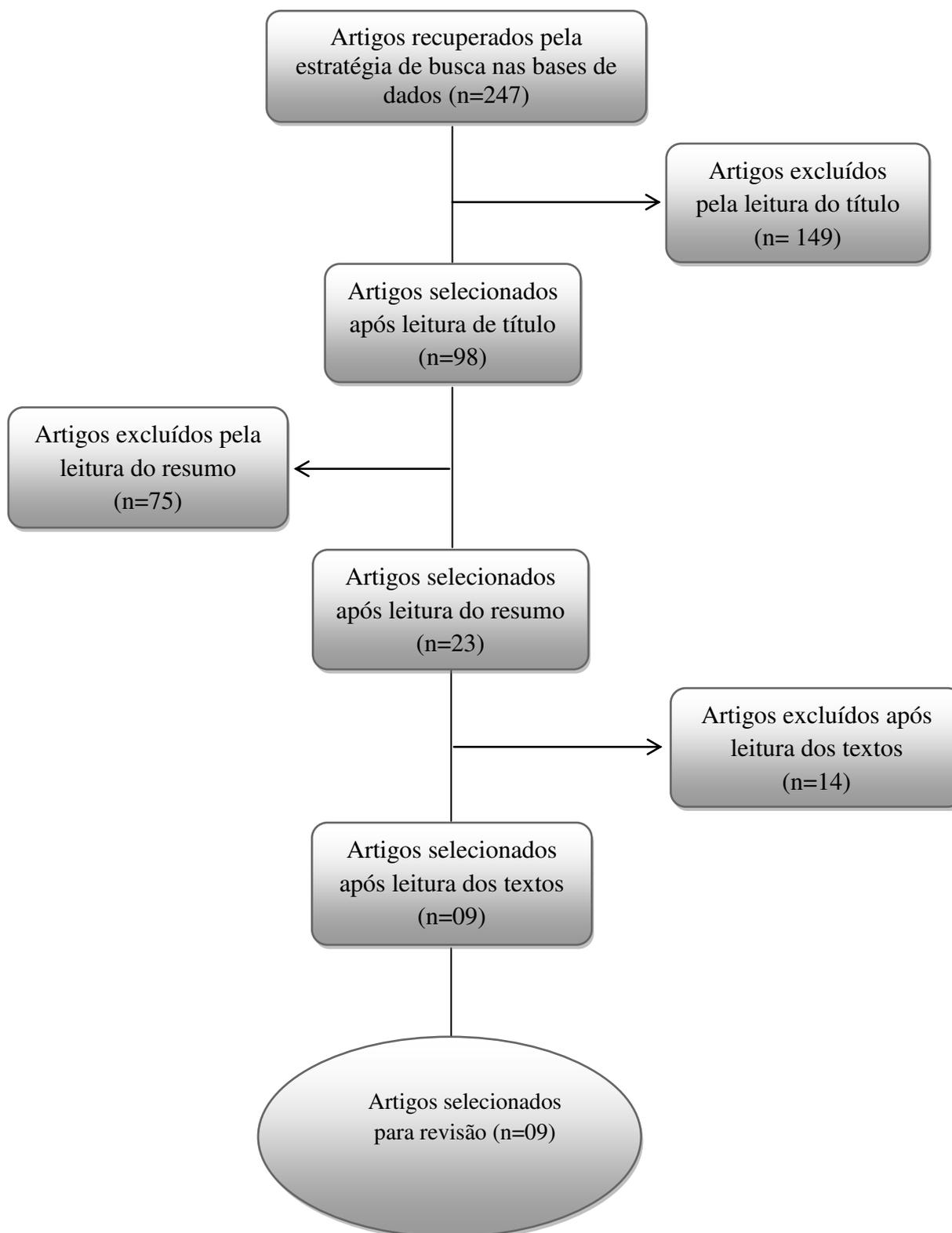


Figura1 – Fluxograma para selecionar os artigos que foram utilizados na revisão sistemática após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.

Tabela 1- Artigos sobre expressão gênica de receptores dopaminérgicos em áreas do cérebro, envolvidas com o comportamento alimentar em ratos, publicados entre 2001 e 2012, identificados segundo autor e ano, país, tipo de receptor, objetivo do estudo, amostra, estrutura cerebral, métodos e resultados.

Autor/Ano	País	Tipo de receptor	Objetivo do estudo	Amostra (n)	Estrutura cerebral	Métodos	Resultados
Sato et al, 2001 ⁽⁴⁴⁾	Estados Unidos	D1, D2	Determinar a expressão gênica de receptores dopaminérgicos no hipotálamo de ratos portadores de anorexia relacionada ao tumor.	15 Ratos Fischer machos n= 8 (grupo estudo) n= 7 (grupo controle)	Hipotálamo	RT-PCR	Aumento da expressão dos receptores D1 e D2 em ratos com anorexia relacionada ao tumor em relação ao grupo controle.
Fetissov et al, 2002 ⁽¹¹⁾	Estados Unidos	D1, D2	Determinar expressão dos receptores D1 e D2 no hipotálamo de ratos obesos e magros.	n= 12 Ratos Zucker machos	Hipotálamo	RT-PCR	Em ratos obesos, ocorreu aumento da expressão do receptor D1 e redução do D2 em comparação com ratos magros.
Kuperstein et al, 2005 ⁽²⁷⁾	Israel	D1, D2	Identificar expressão gênica em cérebros de filhotes de ratas que receberam dietas deficientes de n-3 PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) durante o período perinatal.	14 Ratos Sprague–Dawley n= 8 (grupo estudo) n= 6 (grupo controle)	Hipocampo; VTA (Área Tegmentar Ventral); NAcc (Núcleo Accumbens); Estriado, e PFC (Córtex Pré Frontal)	RT-PCR	Aumento significativo da expressão dos receptores D1 e D2 nas estruturas cerebrais estudadas.
Kuperstein et al, 2008 ⁽²⁸⁾	Israel	D1, D2	Investigar se a dieta materna deficiente em n-3 LNA (ácido linolênico) altera a expressão de componentes-chave da via de neurotransmissão dopaminérgica durante o pós-natal.	11 Ratos Sprague–Dawley n= 5 (grupo estudo) n= 6 (grupo controle)	Hipocampo; VTA; Estriado e PFC	RT-PCR	Aumento significativo da expressão dos receptores D1 e D2 no PFC e Estriado.
Vucetic et al, 2010 ⁽⁴⁸⁾	Estados Unidos	D1, D2	Investigar se a dieta materna rica em gordura altera a metilação e expressão de genes da dopamina e opióides relacionados.	20 Camundongos machos e fêmeas n= 5 (por grupo)	VTA, NAcc; Hipotálamo e PFC	RT-PCR	Ocorreu redução da expressão dos receptores D1 e D2 no NAcc e PFC.

Autor/Ano	País	Tipo de receptor	Objetivo do estudo	Amostra (n)	Estrutura cerebral	Métodos	Resultados
Garcia et al, 2010 ⁽¹⁵⁾	Espanha	D1, D2	Avaliar o restabelecimento do comportamento de busca por alimentos palatáveis induzido por estímulos anteriormente associado à comida palatável.	32 Camundongos machos n= 8 (por grupo)	Hipotálamo, VTA, Estriado dorsal e NAcc	RT-PCR	Ocorreu diminuição da expressão dos receptores D2 no estriado dorsal e NAcc e nenhuma alteração na expressão do receptor D1 .
Alsio et al, 2010 ⁽²⁾	Estados Unidos	D1, D2	Investigar a efeito da exposição à dieta palatável HFHS (alto teor de gordura e açúcar) na expressão dos genes que codificam os receptores de dopamina no NAcc.	60 Ratos Sprague-Dawley e Wistar machos n= 24 (grupo acesso contínuo) n= 16 (grupo acesso restrito) n= 20 (grupo ração controle + HFHS)	NAcc	RT- PCR	Reduziu expressão D1 (grupo acesso contínuo) Reduziu expressão D1 (grupo acesso restrito) Reduziu D1e D2 (grupo acesso restrito em comparação com o grupo ração controle/HFHS)
Ong; Muhlhausler, 2011 ⁽³⁹⁾	Austrália	D1, D2	Examinar o efeito da dieta materna junk-food sobre a expressão de componentes do sistema de recompensa.	21 Ratos Wistar machos e fêmeas n= 11 (grupo controle) n=10 (grupo junk-food)	NAcc , VTA	RT- PCR	Não houve efeito significativo da dieta materna junk-food sobre a expressão de receptores D1 e D2 no NAcc ou VTA
Vucetic et al, 2012 ⁽⁴⁹⁾	Estados Unidos	D1, D2	Investigar alterações na expressão de genes relacionados a dopamina em ratos com (DIO) obesidade induzida por dieta.	22 Camundongos machos n = 7/grupo no Nacc e PFC n = 4/grupo no VTA	VTA, NAcc; Hipotálamo e PFC	RT-PCR	Ocorreu redução da expressão dos receptores D1 no NAcc e PFC e redução e ambos receptores D1 e D2 no VTA. Nenhuma alteração do receptor D2 no PFC

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar provenientes do biotério de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Para obtenção dos animais experimentais, ratos adultos (120 dias) foram acasalados na proporção de 1 fêmea para 1 macho. A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, e confirmada pelo ganho de peso corporal da fêmea. O dia seguinte a este foi considerado o dia 0 (zero) da gestação. No dia 0 as fêmeas gestantes foram transferidas para gaiolas individuais, e durante toda a gestação e lactação receberam as dietas experimentais conforme tabela 1, (normoproteica - caseína 17%) ou (dieta hipoproteica - caseína a 8%), de acordo com os grupos experimentais (normonutrido n=5) e (desnutrido n=6). Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem para a formação das maternidades com 8 filhotes machos por mãe. Durante toda a pesquisa, os filhotes foram mantidos em condições padrão de biotério (temperatura de 22 ± 2 C, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18 horas) e recebendo água ad libitum, segundo recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Após o desmame, todos os animais foram alimentados com ração padrão de biotério. Durante os experimentos de ingestão sob estímulo alimentar (aos 60 dias) ou farmacológico (aos 100 dias) foi ofertado aos animais experimentais dieta palatável Biscoito Cookies (Tabela 2). Todos os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE- processo nº 23076.034632/2010-79 (vide anexo).

3.2 Obtenção dos Grupos Experimentais

Inicialmente, os grupos experimentais foram obtidos aleatoriamente de acordo com a dieta experimental oferecida durante a gestação e lactação (Tabela 1):

- Grupo Controle (C): Constituído de animais nascidos de fêmeas que receberam dieta normoprotéica (Caseína 17%) durante a gestação e lactação (n=30).
- Grupo Desnutrido (D): Constituído de animais nascidos de fêmeas que receberam dieta hipoprotéica (Caseína 8%) durante a gestação e lactação (n=30).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Constituintes	Dieta hipoprotéica (8%)	Dieta normoprotéica (17%)	Dieta Palatável (21%)
G %	100,00	100,0	100,00
Proteínas	8,10	17,30	23,36
Carboidrato	75,10	65,90	48,50
Lipídios	7,00	7,00	15,33
Fibras	5,00	5,00	2,72
Vitaminas	1,00	1,00	1,00
Minerais	3,50	3,50	3,50
Metionina	0,30	0,30	0,30
% Kcal	362,48	363,44	421,41

As dietas foram elaboradas no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. *As vitaminas e mistura mineral foram formulados de acordo com a recomendação da AIN-93G para dietas de roedores [PG Reeves, Nielsen FH, Fahey GC Jr, 1993].

3.3 Agonistas

Os agonistas dopaminérgicos D1 (SKF 38393) e D2 (Quinpirole) foram obtidos na forma cristalina e dissolvidos em água na proporção de 5mg/ml, segundo recomendação do fabricante (Sigma®). Em todos os experimentos, o agonista dopaminérgico D1 foi administrado na dose de 3 mg/kg de peso corporal (Cooper; Al-Naser, 2006), o agonista dopaminérgico D2 na dose de 0,3 mg/kg corporal (Cooper; Al-Naser, 2006). Todos os fármacos foram administrados através da via intraperitoneal.

3.4 Procedimentos experimentais

3.4.1 Peso Corporal

O peso corporal dos animais foi registrado nos intervalos de 30, 60, 90, 120 dias de vida. Para as medidas foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

3.4.2 Ingestão Alimentar

A análise da ingestão alimentar foi realizada aos 60 dias de vida. Neste período os animais dos grupos controle (n=30) e desnutrido (=30), foram alojados em gaiolas individuais, onde foi disponibilizado entre 100-150 gramas de dieta palatável (Tabela 1). Três dias foram utilizados para a adaptação às gaiolas e à dieta, sendo esta oferecida aos animais durante uma hora por dia. O consumo alimentar foi obtido a cada 12 horas dos ciclos de luminosidade (claro/escuro) durante três dias. Para as medidas da ingestão alimentar foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

Tabela 2. Informação Nutricional do alimento Palatável*

Porção de 30g (2 unidades)	
Quantidade por porção	
Valor calórico	147 kcal
Carboidratos	19g
Açúcares	10g
Proteínas	1,8g
Gorduras totais	7,3g
Gorduras saturadas	3,4g
Gorduras trans	0,3g
Fibra alimentar	1,1g
Sódio	63mg

(*) Informações contidas na embalagem do produto: Chocooky Chocolate-Nabisco®

3.4.3 Avaliação da ingestão de alimento palatável sob estímulo dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 durante a idade adulta.

Nessa análise, foram utilizados animais previamente privados (por quatro horas) de alimento. Aos 100 dias de vida, os subgrupos CD1 (n=10) e DD1(n=10) receberam dose aguda do agonista dopaminérgico D1 (SKF 38393) na dose 3 mg/kg de peso corporal, os subgrupos CD2 (n=10) e DD2 (n=10) receberam 0,3 mg/kg de peso corporal do agonista dopaminérgico D2 (Quinpirole) e os subgrupos CA (n=10) e DA (n=10) receberam água destilada no volume de 1ml/kg de peso corporal via intraperitoneal. Uma hora após as injeções, foi disponibilizado alimento palatável (Tabela 1) em quantidade conhecida. Após meia hora, o alimento foi removido e pesado para obtenção do consumo por diferença entre a quantidade oferecida e a rejeitada.

3.4.4 Obtenção de Amostras dos Tecidos Cerebrais.

Aos 120º dia de vida, os animais dos dois grupos foram sacrificados. Os ratos foram previamente pesados e imediatamente decapitados com guilhotina. Após a decapitação foi feita uma craniotomia para a remoção do encéfalo. Com auxílio de instrumental cirúrgico (pinças, tesouras, etc.), os ossos parietais foram afastados a partir da sutura sagital e o encéfalo foi removido.

Posteriormente, foram isolados os núcleos accumbens e estriado e acondicionados em tubos de 1,5 ml devidamente identificados. Todo o material foi congelado em dióxido de carbono solidificado (gelo seco) e mantido em freezer à -80° C para análise molecular por PCR em tempo real.

3.4.5 Procedimentos para PCR em Tempo Real.

a. Homogeneização

As amostras dos tecidos cerebrais congeladas foram imersas em 1mL de TRIzol (Invitrogen®), maceradas e homogeneizadas com Pistilo por 1 minuto.

b. Extração do RNA Total

As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 4°C por 12000g durante 10 min para permitir a completa dissociação de complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram adicionados 200µl de clorofórmio, e os tubos foram agitados vigorosamente por 15 seg., e incubadas em temperatura ambiente por 3 min e centrifugadas (12.000g, 4°C, 15 min). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido (fase aquosa que contém o RNA). A precipitação do RNA foi feita pela adição de 0,5 ml de álcool isopropílico. Seguida de uma incubação em temperatura ambiente por 10 min e centrifugação de 12.000g, 4°C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, permanecendo apenas o precipitado de RNA; este foi lavado com 1mL de etanol 75% em água isenta de RNases. As amostras foram centrifugadas a 7.500g, 4°C por 5 min e o sobrenadante desprezado; o precipitado de RNA foi ressuspendido em água livre de RNases, em volume de 65 µl. A concentração de RNA total foi determinada através da análise do Nanodrop, utilizando 260 nm de comprimento de onda. Preparações com uma razão de densidade óptica 260/280 nm < 1,7 (um dos critérios de pureza da amostra) foram descartadas. As soluções de RNA foram armazenadas a -80°C para posterior análise.

c. Síntese do cDNA

Para a síntese utilizamos 2 µg de RNA total de cada amostra, utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen®). A reação foi iniciada com a mistura das amostras de RNA e dos componentes do kit (gDNAWipeoutBuffer; Quantiscript transcriptase reversa; Quantiscript RT buffer; RT Primer Mix; e água livre de RNases). Para eliminação do DNA genômico, foi preparada uma reação utilizando: 2 µl gDNAWipeout Buffer, 7×; amostras de RNA e água livre de RNases até 14 µl. Incubou-se a 42°C durante 2

minutos e em seguida colocou-se em gelo. O mix de reação da transcrição reversa QuantiTect® foi preparado utilizando: 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase; 4 µl Quantiscript RT Buffer,5x; 1 µl RT Primer Mix e 14 µl da reação de eliminação (que contém o RNA amostral) em seguida foi homogeneizado. Foi adicionado uma alíquota a cada reação de transcrição reversa e assim obteve-se o Mix de cDNA. Após esse processo as amostras foram colocadas no termociclador e incubadas a 42°C durante 15 minutos e logo após, incubadas a 95°C durante 3 minutos para inativar a Quantiscript da transcriptase reversa. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C. Para o controle de reação, foi retirada a enzima de cada amostra em um tubo excedente.

d. PCR em Tempo Real

A reação de PCR foi realizada usando o Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen®) e analisada em tempo real através do sistema de detecção de sequência automatizado Rotor-Gene® TM RG 3000 (Corbett Life Science, Austrália) para determinar a expressão do mRNA das amostras. O volume total da reação foi de 25µl, sendo: 12,5µl do composto fluorescente SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen®), 2µl do cDNA (usado como molde para a reação), 2,5µl para os primers sense e antisense e 5,5µl de água livre de RNases. Para a escolha da concentração ideal de DNA a ser amplificado, foram feitas diluições seriadas do cDNA obtido das amostras, e após a análise da curva padrão de amplificação com as diluições para cada par de primer, foi escolhida aquela com maior eficiência para a concentração de trabalho. Os níveis da expressão dos genes foram comparados em relação ao gene de referência β-Actin. As reações foram incubadas a 95°C por 5 min para a ativação da enzima DNA polimerase, seguido por 40 ciclos de 5 seg a 95°C para desnaturação e de 10 seg a 60°C para anelamento, extensão e coleta do sinal de fluorescência. As amostras referentes ao grupo controle e experimental para cada gene foram processadas sempre na mesma corrida, ou seja, no mesmo set de microtubos e em duplicata. Para

realização da curva de dissociação, ao final dos ciclos, a temperatura foi elevada de 60°C, com incremento de 1°C a cada 5 s, até 90 °C. Os seguintes pares de primers para β actina, D1 e D2 que foram utilizados na reação estão descritos na Tabela 3. Os primers específicos para esses receptores foram desenhados por meio do programa Primer Express (Applied Biosystems), sintetizados e purificados por IDT – Integrated DNA Technologies (EUA). O Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 (Corbett Research, Concord, Austrália) foi utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação, bem como suas análises. Os níveis de expressão relativa de mRNA do receptor dopaminérgico D1 e D2 nas amostras dos tecidos cerebrais foi calculado utilizando o método comparativo Ct (threshold cycle) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), tendo a β actina como gene normalizador. O valor de Δ Ct foi determinado subtraindo o alvo Ct de cada amostra do valor respectivo de β actina. O cálculo de Δ Ct envolveu o valor médio de Δ Ct do grupo controle como uma constante arbitrária para subtrair de todos os valores médios restantes de Δ Ct.

Tabela 3 - Sequência de Primers para os receptores β -Actina, DRD1a, e DRD2 utilizados na reação de RT-PCR.

Gene	Sequência
β -Actina	F 5'-ACGGTCAGGTCATCACTATCG-3' F 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGAG-3'
DRD1a	F 5' -CTGGAGGACACCGAGGATGAC-3' R 5' -GTCGATGAGGGACGATGAAATGG-3'
DRD2	F 5' -CAACAATACAGGCAAACCAGAATGAG-3' R 5' -ACCAGCAGAGTGACGATGAAGG-3'

3.5 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Para demonstrar a diferença entre a ingestão alimentar dos grupos experimentais, os valores foram

transformados em calorias e relativizados pelo peso corporal de cada animal, multiplicado por 100 [(g consumida x cal)/peso do animal) x 100]. Além disso, para comparar a quantidade de alimento ingerido pelos grupos normonutridos e desnutridos em resposta aos agonistas dopaminérgicos D₁ e D₂, os dados foram expressos em porcentagem relacionada à ingestão alimentar dos grupos que receberam aplicação de água destilada. Para as diferenças estatísticas foram utilizados os testes: T student para a ingestão alimentar aos 60 dias de vida e para a expressão gênica dos receptores DRD1a e DRD2. Para os demais experimentos, (peso corporal, ingestão alimentar em resposta aos agonistas D₁ e D₂), utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni pós-teste. O nível de significância foi considerado p igual ou menor que 0,05. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad PRISM 5TM versão 7 (San Diego USA).

4 RESULTADOS

4.1 artigo original a ser submetido à Revista Neuropharmacology (Anexos)

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DRD1a e DRD2 NO NÚCLEO ACCUMBENS E ESTRIADO EM RATOS ADULTOS

Gilvanildo Roberto da Silva^b, Paula Honório de Melo Martimiano^a, Sandra Lopes de Souza^{a,c,d}, Rhowena Jane Barbosa Matos^{c,e}, Amanda Alves Marcelino da Silva^a, Bruno Souza^f, Diogo de Melo Brasileiro^a, Manuela Figueiroa Lyra de Freitas^{b,d,1}.

^aPPG – Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^bPPG – Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^cPPG – Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^dDepartamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

^eNúcleo de Educação Física, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório, s/n, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

^fGraduação em Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

¹Autor Correspondente. Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, R. Profº Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil -CEP: 50670- 420 Tel.: +55 81 2126-8555 - Telefax.: +55 81 2126- 8000 - E-mail: manuelaflf@uol.com

Resumo

Objetivo: Analisar o efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica dos receptores dopaminérgicos DRD1a e DRD2, no núcleo accumbens e estriado em animais adultos. **Método:** Foram utilizados ratos da linhagem Wistar divididos em dois grupos segundo a dieta materna: n=30 normonutrido (17% de caseína) e n=30 desnutrido (8% caseína). Foi analisado o peso corporal entre 15 e 120 dias de vida; a ingestão de alimento palatável sob efeito dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 e a expressão gênica dos receptores DRD1a e DRD2 no núcleo accumbens e estriado. **Resultados:** Animais

desnutridos ingeriram maior quantidade de alimento palatável. Houve redução do consumo de dieta palatável nos grupos normonutridos e desnutridos após aplicação dos agonistas D1 e D2, entretanto, o efeito anorético do agonista D1 foi atenuado nos animais desnutridos. Aumento da expressão gênica do receptor DRD1a no núcleo accumbens e estriado de animais desnutridos, não havendo alterações significativas em relação ao receptor DRD2. **Conclusão:** A desnutrição proteica perinatal altera a expressão gênica do receptor dopaminérgico DRD1a no núcleo accumbens e estriado em ratos adultos e estimula os componentes motivacionais do comportamento alimentar, reduzindo a ação hipofágica do receptor dopaminérgico D1 e contribuindo no aumento do consumo de alimentos palatáveis.

Palavras-Chave: alimento palatável, desnutrição perinatal, pcr em tempo real, receptor D1, receptor D2.

Introdução

O cérebro durante a fase de desenvolvimento é extremamente vulnerável a diferentes tipos de agressões¹. Os efeitos deletérios são evidenciados por diferentes paradigmas experimentais, tais como estresse pré-natal², separação materna³, hipernutrição⁴ e desnutrição durante fases precoces da vida⁵.

A desnutrição é um problema mundial que afeta recém-nascidos e crianças durante os estágios mais vulneráveis do desenvolvimento do SNC, sendo capaz de produzir alterações na maturação e desenvolvimento do cérebro. Estas alterações podem afetar aspectos comportamentais, neuroquímicos, neurofisiológicos e morfofuncionais do padrão normal do funcionamento cerebral e conduzir a alterações persistentes sobre o controle dopaminérgico do comportamento alimentar¹.

Um aspecto a se considerar refere-se às tendências concomitantes de declínio da desnutrição e de ascensão da obesidade, observadas em sociedades em desenvolvimento que experimentam rápidas e intensas transformações em seu padrão de crescimento econômico e estrutura demográfica, fenômeno que caracteriza a denominada “transição nutricional”^{6,7}.

Sendo assim, a obesidade tem se tornado um importante problema de saúde pública mundial, devido ao aumento da sua prevalência e à conseqüente repercussão das suas comorbidades sobre a saúde da população⁸.

Algumas evidências científicas apontam para a intrínseca ação da desnutrição perinatal sobre os mecanismos encefálicos da regulação da ingestão alimentar e sua relação com a etiologia da obesidade⁹, entretanto os mecanismos moleculares, celulares e comportamentais, subjacentes a esse fenômeno, ainda são pouco esclarecidos para explicar sua amplitude de prejuízos à saúde, sendo na atualidade alvo de intensa investigação científica⁹.

Com o objetivo de investigar essa temática, vários pesquisadores vêm realizando diversas pesquisas comportamentais e celulares colaborando com o meio científico para desvendar quais fatores estão associados com o surgimento dessa patologia^{5,10,11}.

O acesso a alimentos palatáveis é considerado atualmente um importante fator de predisposição de desordens metabólicas, a qual está diretamente associada ao surgimento da obesidade¹². A preferência por esse tipo de alimento está associada a respostas hedônicas, como a motivação, a palatabilidade e o prazer^{12,13}. A dopamina participa desses mecanismos através da ação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2^{14,15}.

Segundo alguns autores o receptor dopaminérgico D1 pode contribuir para a motivação do apetite e desempenha um importante papel no aumento do incentivo para adquirir recompensas naturais, como por exemplo, o alimento palatável, e sugerem que a ação dos receptores dopaminérgicos D2 está particularmente voltada à saciedade e não a motivação, por isso, esses receptores atuam principalmente inibindo o consumo de alimentos, controlando tamanho, duração e frequência das refeições^{16,17,18,19,20}.

Mesmo na ausência de fome, o prazer e a sensação de recompensa associados ao alimento podem estimular o consumo. O núcleo acumbens tem sido amplamente relacionado a comportamentos direcionados e aprendizado instrumental apetitivo²¹. Acredita-se que a

liberação da dopamina no núcleo accumbens está associada com a ingestão de alimentos, principalmente os palatáveis, como chocolate e biscoitos¹⁵.

Estudos realizados em humanos utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET scan) mostraram que a ingestão alimentar associa-se à liberação da dopamina no estriado dorsal, e que a quantidade liberada do neurotransmissor se correlaciona com o grau de prazer associado à alimentação²², sugerindo que a regulação dos mecanismos hedônicos pode ser mais complexa.

Embora muitos estudos já tenham fundamentado o papel dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 sobre o comportamento alimentar, a literatura ainda é escassa em relação ao efeito da desnutrição perinatal sobre a função desses receptores, podendo ser esse, um dos mecanismos neurais que esteja relacionado atualmente à etiologia da obesidade na população mundial.

Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar, em ratos adultos, o efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica dos receptores dopaminérgicos DRD1a e DRD2 no NAcc e estriado de ratos adultos, afim de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos no comportamento alimentar e possíveis alterações derivadas da desnutrição perinatal.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar provenientes do biotério de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Para obtenção dos animais experimentais, ratos adultos (120 dias) foram acasalados na proporção de 1 fêmea para 1 macho. A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, e confirmada pelo ganho de peso corporal da fêmea. O dia seguinte a este foi considerado o dia 0 (zero) da gestação. No dia 0 as fêmeas gestantes foram transferidas para

gaiolas individuais, e durante toda a gestação e lactação receberam as dietas experimentais conforme tabela 1, (normoproteica - caseína 17%) ou (dieta hipoproteica - caseína a 8%), de acordo com os grupos experimentais (normonutrido n=5) e (desnutrido n=6). Após o nascimento dos filhotes foi realizada uma randomização com filhotes de várias mães do mesmo grupo experimental e em seguida foi realizada a sexagem para a formação das maternidades com oito filhotes machos por mãe. Durante todo o experimento, os filhotes foram mantidos em condições padrão de biotério (temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18 horas), recebendo ração padrão de biotério e água ad libitum, segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Durante os experimentos de ingestão sob estímulo alimentar (aos 60 dias) ou farmacológico (aos 100 dias) foi ofertado aos animais experimentais dieta palatável (Biscoito Cookies) conforme tabela 2.

Agonistas

Os agonistas dopaminérgicos D1 e D2 foram obtidos na forma cristalina e dissolvidos em água na proporção de 5mg/ml, segundo recomendação do fabricante (Sigma). Em todos os experimentos, o agonista dopaminérgico D1 (SKF 38393) foi administrado na dose de 3 mg/kg de peso corporal e o agonista dopaminérgico D2 (Quinpirole) na dose de 0,3 mg/kg, por via intraperitoneal.

Peso Corporal e Ingestão Alimentar

O peso corporal foi analisado aos 30, 60, 90 e 120 dias de vida. Aos 60 dias de vida os animais dos grupos normonutrido (n=30) e desnutrido (n=30) foram alojados em gaiolas individuais sendo disponibilizado entre 100-150 gramas de dieta palatável (Tabela 1). Três dias foram utilizados para a adaptação às gaiolas e à dieta, sendo esta oferecida aos animais durante uma hora por dia. O consumo alimentar foi obtido a cada 12 horas dos ciclos de

luminosidade (claro/escuro) durante três dias. Para demonstrar a diferença entre a ingestão alimentar dos grupos experimentais, os valores foram transformados em calorias e relativizados pelo peso corporal de cada animal, multiplicado por 100 [(g consumida x cal)] x 100.

Avaliação da ingestão de alimento palatável sob estímulo dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 durante a idade adulta

Nessa análise, foram utilizados animais previamente privados de alimento por quatro horas. Aos 100 dias de vida, os animais dos subgrupos controle D1 (n=10) e desnutrido D1 (n=10) receberam uma dose do agonista dopaminérgico D1, os subgrupos controle D2 (n=10) e desnutrido D2 (n=10) receberam uma dose do agonista dopaminérgico D2 e os subgrupos controle A (n=10) e desnutrido A (n=10) receberam uma dose de água destilada. Meia hora após as injeções foi disponibilizado alimento palatável (Chocooky chocolate Nabisco®) em quantidade conhecida. Após uma hora, o alimento foi removido e pesado para obtenção do consumo por diferença entre a quantidade oferecida e a rejeitada. Para comparar a quantidade de alimento ingerido pelos grupos normonutrido e desnutrido em resposta aos agonistas dopaminérgicos D1 e D2, os dados foram expressos em porcentagem relacionada à ingestão alimentar dos grupos que receberam água destilada.

Isolamento do NAcc e Estriado

Aos 120º dia de vida, os animais dos dois grupos foram sacrificados. Os ratos foram previamente pesados e imediatamente decapitados com guilhotina. Após a decapitação foi feito craniotomia para a remoção do encéfalo e os núcleos accumbens juntamente com o estriado foram isolados e acondicionados em tubos de 1,5 ml devidamente identificados. Todo

o material foi congelado em dióxido de carbono solidificado (gelo seco) e mantido em freezer à -80° C para posterior análise molecular por PCR em tempo real.

Análise da expressão gênica dos receptores DRD1a e DRD2 no NAcc e estriado

Extração do RNA Total

O RNA total do NAcc e estriado foi extraído utilizando 1ml do reagente Trizol (Invitrogen®) conforme instruções do fabricante, tendo sua concentração sido determinada a partir da medida de absorbância a 260 nm.

Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen®). Para eliminação do DNA genômico, foi preparada uma reação utilizando: 2 µl gDNAWipeout Buffer, 7×; amostras de RNA e água livre de RNases até 14 µl. O mix de reação da transcrição reversa QuantiTect® foi preparado utilizando: 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase; 4 µl Quantiscript RT Buffer, 5×; 1 µl RT Primer Mix e 14 µl da reação de eliminação (que contém o RNA amostral). As amostras foram armazenadas no freezer -20°C.

PCR em Tempo Real

A reação de PCR foi realizada usando o Kit SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen®) e analisada em tempo real através do sistema de detecção de sequência automatizado Rotor-Gene® TM RG 3000 (Corbett Life Science, Austrália) para determinação da expressão do mRNA das amostras. O volume total da reação foi de 25µl, sendo: 12,5µl do composto fluorescente SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen®), 2µl do cDNA (usado como molde para a reação), 2,5µl para os primers sense e antisense e 5,5µl de água livre de RNases. As reações foram incubadas a 95°C por 5 min para a ativação da enzima DNA polimerase, seguido por 40 ciclos de 5 seg a 95°C para desnaturação e de 10 seg a 60°C para

anelamento, extensão e coleta do sinal de fluorescência. As sequências dos primers utilizados para amplificação foram: β -actina - forward, 5'- ACG GTC AGG TCA TCA CTA TCG-3' e reverse, 5'- CAG CAC TGT GTT GGC ATA GAG-3'; DRD1a – forward, 5' CTG GAG GAC ACC GAG GAT GAC-3' e reverse, 5'- GTC GAT GAG GGA CGA TGA AAT GG - 3'; DRD2 - forward, 5'- CAA CAA TAC AGG CAA ACC AGA ATG AG- 3' e reverse, 5'- ACC AGC AGA GTG ACG ATG AAG G-3' e foram sintetizados e purificados por IDT – Integrated DNA Technologies (EUA). Os níveis de expressão relativa de mRNA do receptor dopaminérgico DRD1a e DRD2 no Nacc e estriado foi calculado utilizando o método comparativo Ct (threshold cycle)²³, tendo a β actina como gene normalizador.

Análises estatísticas

Para as diferenças estatísticas foram utilizados os testes: t de Student para a ingestão alimentar aos 60 dias de vida e para a expressão gênica dos receptores DRD1a e DRD2. Para os demais experimentos, (peso corporal, ingestão alimentar em resposta aos agonistas D₁ e D₂), utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni pós-teste. O nível de significância foi considerado p igual ou menor que 0,05. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad PRISM 5TM versão 7 (San Diego USA).

Resultados

Efeito da desnutrição perinatal sobre o peso corporal e ingestão de dieta palatável.

O peso corporal dos animais desnutridos se manteve significativamente menor comparado com os animais normonutridos dos 30 até os 120 dias de vida (normonutridos, $96,9 \pm 6,5g$, n=30, versus desnutridos $260,4 \pm 1,64g$, n=30) **p<0,01, ***p<0.001 (Figura 1). Os animais expostos à dieta hipoprotéica durante o período de gestação e lactação ingeriram uma maior quantidade de alimento palatável comparado com o grupo normonutrido durante o

período de teste (normonutridos, $26,8\text{g} \pm 0,3$, $n=30$ versus desnutrido $40,7\text{g} \pm 0,3$, $n=30$)
* $p<0,05$ (Figura 2).

Ação anorética dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 em animais normonutridos e desnutridos.

A aplicação dos agonistas D1 e D2 reduziu o consumo de dieta palatável durante os 60 minutos do experimento nos grupos experimentais (normonutrido, $8,8 \pm 1,18$; $3,0 \pm 0,45$, $n=10$, *** $p<0,001$, versus desnutrido $21,1 \pm 0,19$; $4,8 \pm 0,45$, $n=10$) *** $p<0,001$. Entretanto, o efeito anorético do agonista D1 foi atenuado nos animais desnutridos durante o período de gestação e lactação (normonutrido, $8,8 \pm 1,18$, $n=10$, desnutrido, $21,1 \pm 0,19$, $n=10$) # $p<0,05$. E ao se comparar com os animais tratados com água destilada, o agonista D1 inibiu em 57% a ingestão alimentar no grupo normonutridos e a mesma dose da droga, reduziu apenas em 27% a quantidade de alimento ingerido pelos animais desnutridos. Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de alimento ingerido entre o grupo normonutrido e desnutrido que receberam aplicação do agonista dopaminérgico D2 (normonutrido, $14,77 \pm 0,30$, $n=10$ versus desnutrido, $15,01 \pm 0,45$, $n=10$) Figura 3.

Análise da expressão gênica dos receptores DRD1a e DRD2 no NAcc e estriado

A eficiência da amplificação dos genes DRD1a e DRD2 em relação ao gene normalizador β -actina, foi sistematicamente analisada usando amostras de cDNA de ambos animais controle e desnutridos. Foi encontrada diferença significativa ($p<0,05$) nos níveis de expressão do gene DRD1a de animais desnutridos ($D= 1,89 \pm 0,45$) em relação aos animais controle ($C= 1,29 \pm 0,30$), sendo este aumento de 46%. (Figura 4).

Com relação a expressão do gene DRD2, a média do nível de expressão nos animais desnutridos foi de ($D= 1,29 \pm 0,30$) e nos animais controle ($C= 1,07 \pm 0,22$), portanto a expressão dos níveis de mRNA não foi estatisticamente significativa ($p<0,05$). (Figura 5).

A expressão relativa dos níveis de mRNA do receptor DRD1a estava aumentada no NAcc e estriado de animais desnutridos em relação ao controle.

Discussão

A desnutrição, especialmente a proteico-energética, tem sido um problema para grande parte da humanidade e frequentemente aparece como causa de várias alterações no desenvolvimento humano, entretanto, os mecanismos que relacionam desnutrição e déficits de desenvolvimento ainda não estão totalmente estabelecidos.

Pesquisas sugerem que intervenções nutricionais nos períodos iniciais da podem estar associadas com alterações no comportamento alimentar na vida adulta, particularmente sobre componentes das vias de recompensa alimentar^{24,25,26}.

O presente estudo fornece evidências de que a desnutrição proteica perinatal altera a expressão dos níveis de mRNA do receptor dopaminérgico DRD1a nos núcleos accumbens e estriado em ratos adultos, reduz a ação hipofágica do agonista do receptor dopaminérgico D1, e contribui para o aumento do consumo de alimentos palatáveis.

Os resultados mostram que os animais que foram submetidos à desnutrição proteica perinatal apresentam uma redução de peso corporal em relação aos animais do grupo controle.

Esses achados são consistentes com estudos anteriores que confirmam que a causa mais frequente de alterações do peso corporal em períodos precoces da vida é o aporte nutricional materno durante o período de gestação e lactação^{27,28,29,30,31}. Portanto, a redução da ingestão calórico-energética, sobretudo em períodos de elevado crescimento/desenvolvimento como a gestação e lactação, pode limitar o crescimento de órgãos e tecidos³².

De fato, há relatos na literatura que mostram que ratas alimentadas durante a gravidez e lactação com dietas deficientes em proteína diminuí o tamanho da ninhada e a massa corporal de filhotes^{33,34,35}.

Outras pesquisas sugerem que a restrição proteica materna no início ou a partir da segunda metade da gestação afeta o número de fibras musculares da prole, observado em estudos realizados em ratos, cães e macacos com baixo peso ao nascer^{36,37,38}.

Há duas fases consecutivas do desenvolvimento normal do tecido. Todos os órgãos e tecidos crescem inicialmente por proliferação celular (hiperplasia) e subsequentemente pelo aumento do volume celular (hipertrofia)³⁹. Na deficiência protéico-energética podem ocorrer hipoplasia e atrofia de tecidos⁴⁰ e desta forma uma diminuição do tamanho corporal e de órgãos^{38,41}.

Uma diminuição do número de células devido à restrição nutricional no início da vida intra-uterina tende a resultar em deficiência de crescimento permanente, enquanto uma redução no tamanho das células causada pela restrição nutricional no final da gestação ou na vida pós-natal pode ser recuperável⁴².

A presente pesquisa indica que, os animais que tiveram um baixo peso ao nascer apresentaram também um alto consumo de alimentos palatáveis na vida adulta. Esses dados corroboram com estudos experimentais anteriores realizados em animais que foram submetidos a restrição proteica durante o período de gestação e lactação e resultou também em hiperfagia^{25,43,44} e uma elevada preferência por alimentos ricos em açúcar e gordura⁴⁵. Evidências na literatura descrevem que o consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura provoca modificações neuroquímicas em sistemas neurotransmissores como o mesolímbico, envolvido no comportamento alimentar e na recompensa^{46,47}.

A neurotransmissão dopaminérgica no sistema nervoso central (SNC) está associada às respostas hedônicas, como a palatabilidade e o prazer ao consumir alimentos ricos em

energia⁴⁷. Notavelmente, tanto os receptores D1 quanto os receptores D2 estão intimamente associados com o controle da ingestão de alimentos, principalmente os palatáveis⁴⁸.

Alguns estudos, com o objetivo de investigar os efeitos dos agonistas dopaminérgicos e suas funções sobre a ingestão de alimentos, relatam o efeito anorético dos agonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo D1^{13,48,49,50,51}, entretanto, evidências mais recentes sugerem que esses receptores estão envolvidos na preferência por alimentos palatáveis⁵². No presente estudo, foi observado que a administração de agonistas dos receptores D1 e D2 promoveu redução do consumo de alimentos palatáveis independente do histórico nutricional dos animais avaliados. Esses dados são consistentes com pesquisas subjacentes onde os agonistas para os receptores D1 e D2 reduziram a ingestão alimentar, entretanto, por mecanismos diferentes. Os agonistas do receptor D1 induzem a redução da ingestão alimentar por uma diminuição do número de episódios de alimentação, enquanto que agonistas D2 levam a diminuição da quantidade de alimento ingerido⁵³.

O efeito dos agonistas D1 e D2 foi comparado com relação à ingestão alimentar, e foi constatado que os animais desnutridos foram menos responsivos à ação anorética do agonista D1 e mais motivados a consumir alimentos palatáveis. Esses achados complementam um trabalho recente, em que o agonista do receptor D1, aumentou a preferência de ratos por alimentos altamente palatáveis⁵⁴, comprovando que a desnutrição perinatal reduz a ação hipofágica do agonista do receptor dopaminérgico D1. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado após aplicação do agonista para o receptor D2 no qual pareceu atenuar a preferência por alimentos palatáveis como consequência da inibição da via dopaminérgica no cérebro. Além disso, nos animais desnutridos, a redução da ação hipofágica do agonista do receptor D1, por sua vez prejudica a via dopaminérgica da regulação alimentar, e isso juntamente com outros fatores, (hedônicos, homeostáticos, genéticos) podem estar

relacionados à hipótese que fundamenta o surgimento da obesidade a partir de insultos perinatais.

De fato, está bem fundamentado na literatura que o consumo de alimento palatável induz a ativação do sistema de recompensa⁵⁵, e se observa que ratos expostos ao alimento doce exibem uma maior resposta dopaminérgica, medida pela liberação aumentada de dopamina no núcleo accumbens e no córtex pré-frontal medial⁵⁶. Todavia, os exatos mecanismos pelos quais o núcleo accumbens executa estas funções ainda não estão totalmente esclarecidos⁵⁷. Entretanto, apesar de serem escassos os estudos do efeito da desnutrição sobre os receptores dopaminérgicos, já foi relatado níveis elevados de dopamina encefálica em animais desnutridos⁵⁷. Da mesma forma, os resultados do presente estudo mostram que a expressão relativa dos níveis de mRNA do receptor DRD1a encontrou-se aumentada no núcleo accumbens e estriado de animais desnutridos em relação aos animais normonutridos, não havendo alterações significativas em relação ao receptor DRD2.

As primeiras evidências científicas mostraram que a estimulação dos receptores D2 levou a redução na quantidade de alimentos ingeridos por animais^(15,20,58), e sua disfunção, um aumento na ingestão alimentar.

Existem estudos que demonstram que esse tipo de receptor se encontra alterado, em níveis mais baixos, em animais e humanos obesos^(59,60). Eles parecem mediar a função inibitória que a dopamina tem sobre o controle do apetite e sua disfunção contribui para o surgimento de doenças metabólicas⁽⁵⁹⁾. Recentes estudos corroboram com esses resultados, reforçando a ideia de que os receptores dopaminérgicos D2 estão intimamente relacionados com a manutenção do balanço energético por atuarem ao nível do sistema nervoso central, inibindo o consumo de alimentos, demonstrando sua particular importância na regulação do apetite e conseqüentemente no surgimento da obesidade e suas patologias associadas^(61,62,63,64).

Como o sistema dopaminérgico está criticamente envolvido no comportamento alimentar, será necessário dados mais detalhados sobre a regulamentação da expressão dos receptores dopaminérgicos, especialmente os receptores D1 e D2 os quais estão intimamente envolvidos com a ingestão alimentar, para melhor entendimento sobre os mecanismos do envolvimento das vias dopaminérgicas no controle da ingestão alimentar, buscando mecanismos para normalizar a neurotransmissão dopaminérgica no cérebro com o objetivo final do tratamento de comportamentos de dependência, incluindo a hiperfagia da obesidade.

Conclusão

Os resultados deste estudo mostram que a desnutrição proteica perinatal altera a expressão gênica do receptor dopaminérgico DRD1a no núcleo accumbens e estriado em ratos adultos e estimula os componentes motivacionais do comportamento alimentar, reduz a ação hipofágica do receptor dopaminérgico D1 e contribui para o aumento do consumo de alimentos palatáveis.

A menor quantidade nos níveis de expressão gênica de receptores DRD2 em relação aos receptores DRD1 expressos no núcleo accumbens e estriado, pode estar relacionado a uma resposta neuroadaptativa ao aumento da ingestão de alimentos palatáveis.

Como atualmente observa-se, na população mundial o elevado consumo de alimentos ricos em lipídios e carboidratos, o conhecimento de mecanismos moleculares que determinam a preferência por esses tipos de alimentos, bem como o entendimento da relação de tais mecanismos com o ambiente nutricional precoce, pode ser um importante alvo para prevenção e tratamento da obesidade e suas patologias associadas.

Referências

- 1 Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 26(4): 471-83. 2002.
- 2 Vallée M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci*, Apr 1; 17(7):2626-36. 1997.
- 3 Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*. Dec; 64(4):705-15. 1999.
- 4 Alsjö J, Olszewski PK, Norbäck AH, Gunnarsson ZEA, Levine AS, Pickering C, Schiöth HB. Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience* 171: 779-87. 2010.
- 5 Lopes SS, Orozco-SR, Grit I, Manhães CR, Bolaños-JF. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci*. 27(6): 1400-1408. 2008.
- 6 Popkin BM. Nutrition patterns and transitions. *Popul Dev Rev*. 19: 138-57. 1993.
- 7 Popkin BM. The nutrition transition in low income countries: an emergency crisis. *Nutr Rev*. 52:285-98. 1994.
- 8 Diemen VV, Trindade EM, Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir. Brás*. 21(6):425-429. 2006.
- 9 Zheng H, Lenard NR, Shin AC, Berthoud HR. Appetite control and energy balance regulation in the modern world: reward-driven brain overrides repletion signals. *Int J Obes (Lond)* Jun;33 Suppl 2:S8-13. 2009.
- 10 Souza LS, Orozco-Solis R, Grit I, Castro RM, Bolaños-Jiménez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *The European Journal of Neuroscience*, v.27, n.6, Mar, p.1400-8. 2008.
- 11 Orozco-Solis R, Matos RJ, Guzmán-Quevedo O, Souza LS, Bihouée A, Houlgatte R, Castro RM, Bolaños-Jiménez F. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One*, v.5, n.10, p.e13537. 2010.

- 12 Oliveira LS, Silva LP, Silva AI, Magalhães CP, Souza SL, Castro, RM. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. *Behavioural Processes (Print) JCR*, v. 86, p. 119-124, 2011.
- 13 Berridge, K. C.; Kringelbach, M. L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl) [S.I.]* 199 (3):457-80. 2008.
- 14 Yamamoto, T. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Arch Histol Cytol [S.I.]* 69(4):243-55. 2006.
- 15 Beaulieu JM; Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*. Mar; 63(1): 182-217. 2011.
- 16 Wang L, Xu RJ. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. *Asia Pac J Clin Nutr [S.I.]* 16 Suppl 1: 467-72. 2007.
- 17 Robinson S, Sandstrom SM, Denenberg VH, Palmiter RD. Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behav Neurosci* 119:5–15. 2005.
- 18 Del Parigi AK, Chen AD, Salbe EM, Reiman PA, Tataranni. Are we addicted to food? *Obes. Res.* 11: 493–5. 2003.
- 19 Vucetic Z, Reyes TM. Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: implications for the regulation of obesity. *WIREs Systems Biology and Medicine*, Sep-Oct; 2(5):577-93. 2010.
- 20 Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Thanos PK, Logan J. Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: Possible contributing factors. *Neuroimage* 42: 1537-1543. 2008.
- 21 Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci.* May 1; 22(9):3306-11. 2002.
- 22 Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage.* 19:1709–15. 2003.
- 23 Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods.* 25:402-8. 2001.
- 24 Pollitt E, Gorman KS, Engle PL, Martorell R, Rivera J. Early supplementary feeding and cognition: effects over two decades. *Monogr Soc Res Child Dev* 58:1-122. 1993.

- 25 Vickers, MH, Breier, BH. 2000. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, v.279, p.83–87. 2000.
- 26 Padoim, MJ.; Cadore, L.P. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav. Neurosci*, v.115, p.1332–1340. 2001.
- 27 Smart, JL, Preece, J. Maternal behavior of undernourished mother rats. *Anim Behav [S.I.]*, v. 21, n. 3, p. 613-9, Aug 1973.
- 28 Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr [S.I.]*, v. 130, n. 10, p. 2582-9, Oct 2000.
- 29 Remmers F, Fodor M, Delemarre-van de Waal HA. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. *Physiol Behav [S.I.]*, v. 95, n. 1-2, p. 208-15, Sep 3 2008.
- 30 Orozco-Sólis R, Souza SL, Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Castro RM. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiology & Behavior*, v. 96, p. 481-492, 2009.
- 31 Page KC, Malik RE, Ripple JA, Anday EK. Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol [S.I.]*, v. 297, n. 4, p. R1049-57, 2009.
- 32 Mahan LK, Escott-Stump S, Krause S. Food, nutrition and diets therapy. 9th ed. Philadelphia: Saunders. cap.12, 17. 1996.
- 33 Seegers, WH. The effect of protein deficiency on the course of pregnancy. *Amer. J.Physiol.*, v. 119, p. 474-480, 1937.
- 34 Curtiss C. Effects of a low protein intake on the pregnant rat. *Metabolism.*, v. 2, p. 344,1953.
- 35 Nelson MM, Evans HM. Relation of dietary protein levels to reproduction in the rat. *J. Nutr.*, v. 51, p. 71, 1953.
- 36 Nascimento OJ, Madi K, Guedes e Silva JB, Soares Filho PJ, Hahn MD, Couto B, et al.Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica.*Arq Neuropsiquiatr.* 48:395-402. 1990.

- 37 Oliveira FL, Oliveira AS, Schimidt B, Amâncio OM. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. *J Pediatr (Rio J)*. 75:350-6. 1999.
- 38 Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *J. Pediatr (Rio J)* 78:39-44. 2002.
- 39 Winick M, Rosso P, Brasel JA. Malnutrition and cellular growth in the brain: existence of critical periods. In: *Ciba Foundation Symposium Lipids, malnutrition and development brain*. Amsterdam: Elsevier Excerpta Medica; p.199-211. 1972.
- 40 Robbins, SL; Cotran, RS; Kumar, V. Distúrbios nutricionais. In: Robbins, SL; Cotran, RS, Kumar, V. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Interamericana p. 390. 1986.
- 41 Madi, K; Campos, SD. Desnutrição experimental: resultados anátomo-patológicos e bioquímicos da administração de dietas hipoprotéicas a ratos albinos jovens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 73(3), p. 153-181, 1975.
- 42 Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res*. 9:154-6. 1975.
- 43 Desai, M.; Gayle, D; Babu, J; Ross, M.G. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.288, p.91–96. 2005.
- 44 Bellinger, L; Langley-Evans, S.C. Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clin. Sci.*, v.109, p.413– 420. 2005.
- 45 Bellinger, L; Lilley, C; Langley-Evans, S.C. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br. J. Nutr.*,v. 92, p.513–520. 2004.
- 46 Bellinger, L; Sculley, DV.; Langley-Evans, S.C. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int. J. Obes. (Lond.)*, v.30, p.729–738. 2006.
- 47 Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav*. 2:55-59. 1967.
- 48 Kuo DY. Co-administration of dopamine D1 and D2 agonists additively decreases daily food intake, body weight and hypothalamic neuropeptide Y level in rats. *J Biomed Sci* 9: 126-32. 2002.

- 49 Gambarana C, Masi F, Leggio B, Grappi S, Nanni G, Scheggi S, De Montis MG, Tagliamonte A. Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. *Neuroscience*. 121:179-87. 2003.
- 50 Goto, Y; Grace, AA. Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. *Trends Neurosci.*, v. 31, p. 552-558, 2008.
- 51 Halford JCG, Wanninayake SCD, Blundell JE. Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the Diagnosis of Drug Action on Food Intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 61, No. 2, pp. 159–168, 1998
- 52 Cooper, SJ; Al-Naser, HA; Clifton, PG. The anorectic effect of the selective dopamine D1-receptor agonist A-77636 determined by meal pattern analysis in free-feeding rats. *European journal of pharmacology*, v.532, n.3, p.253-7. 2006.
- 53 Timmerman W, Rusk IN, Tepper P, Horn AS, Cooper SJ. The effect of enantiomers of the dopamine agonist N-0437 on food consumption and yawning behaviour in the rat. *Eur. J. Pharmacol*, v.174, p.107-114. 1989.
- 54 Terry, P; Katz, JL. Differential antagonism of the effects of dopamine D1-receptor agonists on feeding behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, v.109, n.4, p.403-9. 1992.
- 55 Spiller K, Xi ZX, Peng XQ, Newman AH, Ashby CR Jr, Heidbreder C, Gaál J, Gardner EL. The selective dopamine D3 receptor antagonists SB-277011A and NGB 2904 and the putative partial D3 receptor agonist BP-897 attenuate methamphetamine-enhanced brain stimulation reward in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v.196, n.4, Mar, p.533-42. 2008.
- 56 Cooper, SJ; Francis, J; Rusk, I, N. The anorectic effect of SK&F 38393, a selective dopamine D1 receptor agonist: a microstructural analysis of feeding and related behavior. *Psychopharmacology*, v.100, p.182-I 87. 1990.
- 57 Valdomero A, Velazquez EE, de Olmos S, de Olmos JS, Orsingher OA, Cuadra GR. Increased rewarding properties of morphine in perinatally protein-malnourished rats. *Neuroscience*, v.150 p.449–458. 2007.
- 58 Johnson, PM; Kenny, PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience*. v. 13, n.5. 2010.

- 59 Stice, E; Yokum, S; Blum, K; Bohon, C. Weight Gain Is Associated with Reduced Striatal Response to Palatable Food. *The Journal of Neuroscience*, September 29 • 30(39):13105–13109 2010.
- 60 Van der Weide J, De Vries JB, Tepper PG, Horn AS. Pharmacological profiles of three new, potent and selective dopamine receptor agonists: N-0434, N-0437 and N-0734. *Eur J Pharmacol*. Jun 17;125(2):273-82. 1986.
- 61 Van der Weide J, Camps M, Horn AS, Palacios JM. Autoradiographic localization of dopamine D2 receptors in the rat brain using the new agonist [3H]N-0437. *Neurosci Lett*. Dec 29;83(3):259-63. 1987.
- 62 Van der Weide J, De Vries JB, Tepper PG, Krause DN, Dubocovich ML, Horn AS. N-0437: a selective D-2 dopamine receptor agonist in in vitro and in vivo models. *Eur J Pharmacol*. Mar 1;147(2):249-58. 1988.
- 63 Crunelle CL, van de Giessen E, Schulz S, Vanderschuren LJ, de Bruin K, van den Brink W. Cannabinoid-1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) increases striatal dopamine D2 receptor availability. *Addict Biol*. 2011.
- 64 Martín-García E, Burokas A, Kostrzewa E, Gieryk A, Korostynski M, Ziolkowska B, Przewlocka B. New operant model of reinstatement of food-seeking behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 May; 215(1):49-70. Epub Dec 14. 2010.

FIGURAS

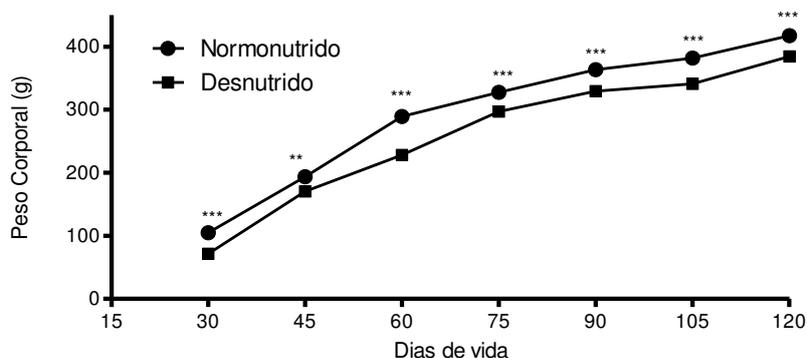


Figura 1. Peso corporal médio dos filhotes machos nascidos de fêmeas alimentadas com uma dieta normoproteica (caseína 17%) ou hipoproteica (caseína 8%) durante o período de gestação e lactação. Ao desmame, os filhotes foram alimentados com dieta padrão de biotério. Os dados representam média \pm SEM com $n=30$ para animais controle e $n=30$ para animais desnutridos. A análise foi realizada entre 30 e 120 dias de vida. As diferenças no peso corporal entre o controle e os animais desnutridos são estatisticamente significativas com $**p < 0,01$ em 45 dias e $***p < 0,001$ em todas as outras idades analisadas (two-way ANOVA para medidas repetidas seguidas por Bonferroni pós-teste). g = gramas.

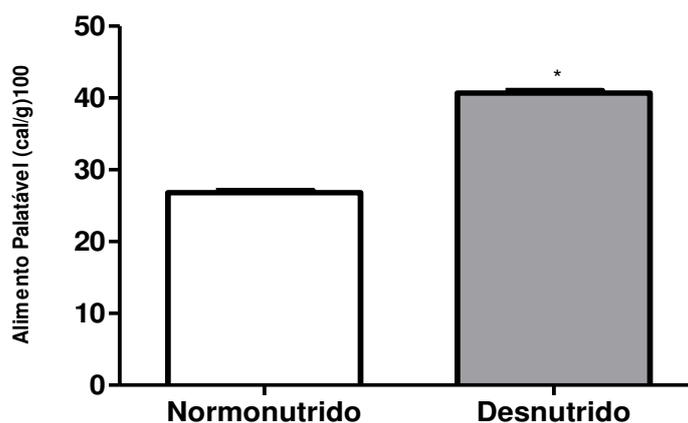


Figura 2. Ingestão alimentar dos filhotes machos, aos 60 dias de vida, nascidos de fêmeas alimentadas com uma dieta normoproteica (caseína 17%) ou hipoproteica (caseína 8%) durante o período de gestação e lactação. Cada barra representa a quantidade média de alimento palatável ingerido durante três dias consecutivos aos 60 dias de vida. Valor expresso em calorias por grama do peso corporal de cada animal. Dados correspondem à média \pm SEM com $n=30$ para animais controle e $n=30$ para animais desnutridos. test t de Student para comparação entre grupos * $p < 0,05$.

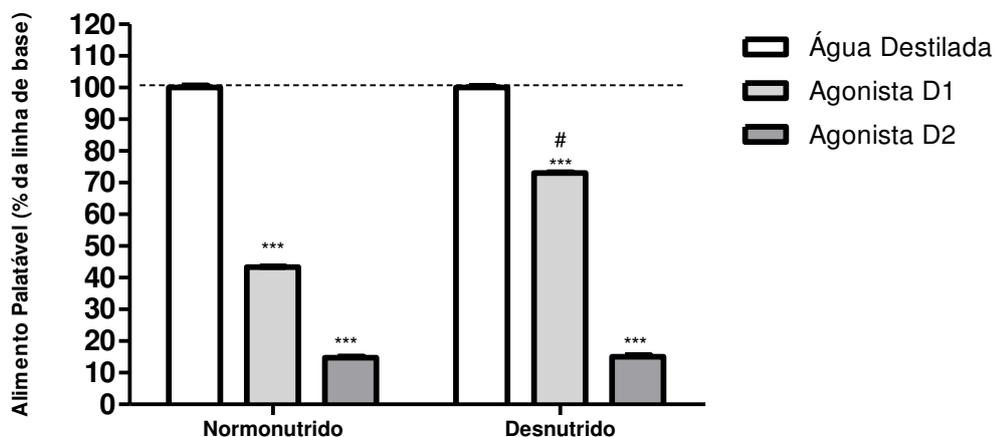


Figura 3. Efeito dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 sobre o consumo de alimento palatável em animais que foram submetidos à desnutrição perinatal. Foram utilizados 10 animais para cada grupo experimental analisado, os quais receberam dose aguda dos agonistas D1 (3 mg/kg), D2 (0,3mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os dados correspondem à quantidade de dieta palatável consumida em 60 minutos de teste, os quais foram expressos como porcentagem da quantidade de alimento consumido pelos animais que receberam aplicação de água destilada (linha de base). *** $p < 0,001$ quando os valores foram comparados com os animais que receberam aplicação de água destilada do mesmo grupo e # $p < 0,05$ quando os valores foram comparados com os animais normonutridos que receberam a mesma dose do agonista D1 (two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste). Não houve diferença estatisticamente significante na quantidade de alimento ingerido entre o grupo normonutrido e desnutrido que receberam aplicação do agonista D2.

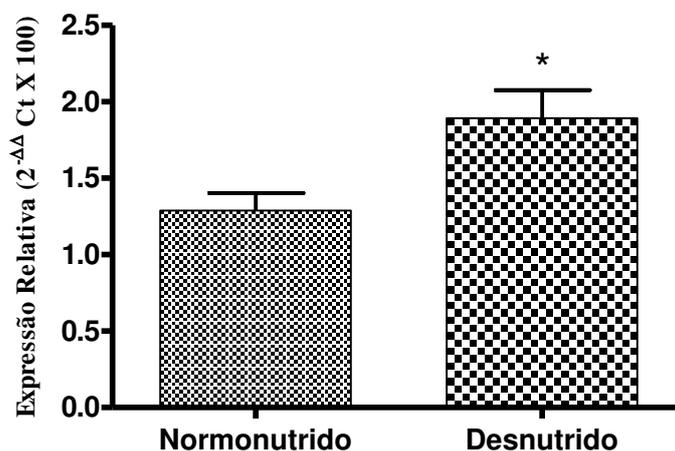


Figura 4. Expressão gênica do receptor dopaminérgico DRD1a em relação a β -actina no NAcc e estriado em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados correspondem à média \pm SEM com $n = 6$ para animais normonutridos ($1,29 \pm 0,30$) e $n = 7$ para animais desnutridos ($1,89 \pm 0,45$). A diferença da expressão gênica dos receptores DRD1 entre os grupos nutridos e desnutridos foram estatisticamente significativas. test t student para comparação entre grupos * $p < 0,05$.

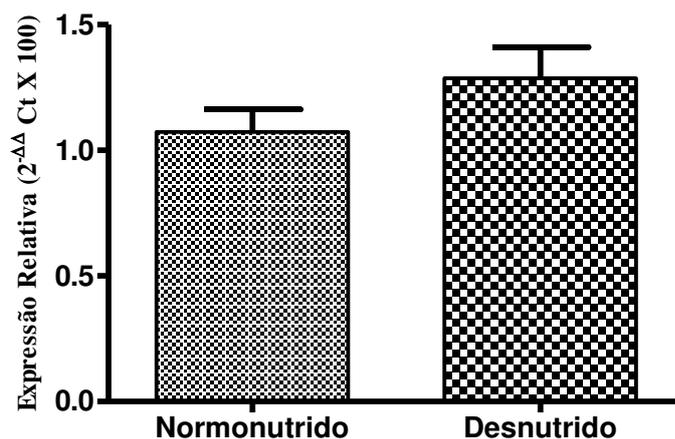


Figura 5. Expressão gênica do receptor dopaminérgico **DRD2** em relação a β -actina no NAcc e estriado em ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. Os dados correspondem à média \pm SEM com $n = 6$ para animais normonutridos ($1,07 \pm 0,22$) e $n = 6$ para animais desnutridos ($1,29 \pm 0,30$). test t student para comparação entre grupos * $p < 0,05$. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica dos receptores dopaminérgicos DRD2 entre os grupos normonutridos e desnutridos.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Constituintes	Dieta hipoprotéica (8%)	Dieta normoprotéica (17%)	Dieta Palatável (21%)
G %	100,00	100,0	100,00
Proteínas	8,10	17,30	23,36
Carboidrato	75,10	65,90	48,50
Lipídios	7,00	7,00	15,33
Fibras	5,00	5,00	2,72
Vitaminas	1,00	1,00	1,00
Minerais	3,50	3,50	3,50
Metionina	0,30	0,30	0,30
% Kcal	362,48	363,44	421,41

As dietas foram elaboradas no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. *As vitaminas e mistura mineral foram formulados de acordo com a recomendação da AIN-93G para dietas de roedores [PG Reeves, Nielsen FH, Fahey GC Jr, 1993].

Tabela 2. Informação Nutricional do alimento Palatável*

Porção de 30g (2 unidades)	
Quantidade por porção	
Valor calórico	147 kcal
Carboidratos	19g
Açúcares	10g
Proteínas	1,8g
Gorduras totais	7,3g
Gorduras saturadas	3,4g
Gorduras trans	0,3g
Fibra alimentar	1,1g
Sódio	63mg

(*) Informações contidas na embalagem do produto: Chocooky Chocolate-Nabisco®

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve o objetivo geral de avaliar o efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão gênica de receptores dopaminérgicos DRD1a e DRD2 no núcleo accumbens e estriado de ratos adultos, considerando os aspectos morfológicos, funcionais e comportamentais da via de recompensa alimentar. Foram realizadas análises dos efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o peso corporal e da ingestão alimentar; dos efeitos dos agonistas dopaminérgicos D1 e D2 (SKD 38393 e Quinpirole) sobre a ingestão alimentar, e por fim a análise da expressão gênica de receptores dopaminérgicos DRD1a e DRD2 no núcleos accumbens e estriado em ratos adultos submetidos a desnutrição proteica perinatal.

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que a desnutrição proteica perinatal altera a expressão gênica do receptor dopaminérgico DRD1a no núcleo accumbens e estriado em ratos adultos e estimula os componentes motivacionais do comportamento alimentar, reduz a ação hipofágica do receptor dopaminérgico D1 e contribui para o aumento do consumo de alimentos palatáveis.

Esses dados são consistentes com os relatos da literatura aos quais evidenciam que a desnutrição perinatal induz adaptações neurais que são responsáveis pelas alterações da expressão gênica de receptores dopaminérgicos em áreas do cérebro envolvidas com a regulação do comportamento alimentar.

A ativação da via de recompensas do sistema mesolímbico cria uma sensação de prazer e interfere com os sinais fisiológicos de saciedade, o que promove o consumo maior de alimentos palatáveis. O acesso a alimentos palatáveis com alto teor energético é considerado fator de risco para a obesidade.

Apesar dos espetaculares progressos da neurociência e, destas, em especial, aos relacionados aos efeitos promovidos pela desnutrição sobre o cérebro, ainda há muitas lacunas a preencher. Sendo assim, futuros estudos são necessários envolvendo: tamanho amostral

maior, análise de outras estruturas cerebral do sistema de recompensa, assim como investigações mais detalhadas que analisem a sensibilidade dos receptores D1 e D2 sobre o metabolismo de seres desnutridos.

Os testes de motivação, sequência comportamental de saciedade, preferência a sacarose, Imunohistoquímica para Proteína C-Fos, estudos bioquímicos, além de análise detalhada da expressão gênica dos receptores D1 e D2 nas demais estruturas cerebrais envolvidas com o comportamento alimentar, são algumas das ferramentas que pretendemos utilizar nas futuras investigações sobre o efeito da desnutrição proteica perinatal sobre o controle dopaminérgico do comportamento alimentar.

Por isto algumas perspectivas do presente estudo consistem em analisar em animais normonutridos e desnutridos:

- Preferência por diferentes concentrações de sacarose em resposta aos agonistas do receptor D1 e D2.
- Distribuição dos neurônios, no encéfalo, ativados pelo agonista do receptor D1 e D2 e/ou pelo estímulo alimentar.
- Expressão gênica do receptor dopaminérgico D1 e D2 no núcleo accumbens, estriado, área tegmentar ventral, córtex pré-frontal e hipotálamo.
- Expressão da proteína DARPP-32 no núcleo accumbens, estriado, área tegmentar ventral, córtex pré-frontal e hipotálamo.

6 REFERÊNCIAS

- AKMAN, C. Z. Q.; LIU, X.; HOLMES, G. L. Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. **Epilepsy and Behavior**, v.5, n.4, p.446-454. 2004.
- ALMEIDA, S.S.; GARCIA, R. M.; DE OLIVEIRA, L.; M. Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 749-752, 1993.
- _____ ; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Malnutrition and Reactivity to Drugs Acting in the Central Nervous System. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v 20, 3, p 389-402, 1996
- ANISSA, A.B.I-DARGHAM. Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D1 receptors tell us?. **Research report**. 2003.
- AVENA, N.M.; RADA, P.; HOEBEL, B.G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. **Neurosci Biobehav Rev.** 32:20-39. 2008.
- BATISTA FILHO, MB; RISSIN, A. Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. **Cad. Saúde Pública**. v. 19, supl. 1, p. S181-S191, 2003.
- BEAULIEU J.M.; GAINETDINOV R.R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacological Reviews**. Vol. 63, No. 1. P. 182-217. 2011.
- BEN-JONATHAN, N. e HNASKO, R. Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. **Endocrine Reviews**, v.22, n.6, Dec, p.724–763. 2001.
- BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH M. L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology (Berl)**, v.199, n.3, Aug, p.457-80. 2008.
- BLUM, K. A. et al. Reward Deficiency Syndrome. **American Scientist** 84: 132–145. 1996.
- _____ ; KOZLOWSKI G.P. Ethanol and neuromodulator interactions: a cascade model of reward. **Progress in Alcohol Research** 2:131-149. 1990.
- BOHRER, M. S. A. Nutrição parental: quando iniciar. 2007. Disponível em <www.paulomargotto.com.br/documentos/aa_precoce_nutricao.doc>. Acesso em jun. 2012.
- BRAKE, W.G. et al. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. **Eur J Neurosci**, v.19, p.1863–74. 2004.
- BREIER, B.H. et al. Fetal programming of appetite and obesity. **Mol Cell Endocrinol**, 185:73-9. 2001.

BUNZOW, J.R. et al. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. **Nature**, 336:783-787. 1988.

CARDOSO F. et al. Importância dos Agonistas Dopaminérgicos nas Fases Inicial e Avançada da Doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, 14:161-165. 2006.

CARLSSON, A.; WALDECK, B. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). **Acta Physiol Scand**, 44: 293-298.1958.

CHARMANDARI, E. et al. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. **Horm Res**. 59:161-79. 2003.

CINTRA, L. et al. Effects of prenatal Protein Malnutrition on Mossy Fibers of the Hippocampal Formation in Rats of Four Age Groups, **Hippocampus**, 2:184-191, 1997.

CLONINGER, C.R.Genetic and environmental factors in the development of alcoholism. **Journal of Psychiatric Treatment Evaluation** 5:487-496.1983.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal. 1991. disponível em <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>

COLANTUONI, C. et al. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. **Obes Res**, 10:478-88. 2002.

CONWAY, B.; RENE, A. Obesity as a disease: no lightweight matter. **Obes Rev**, v.5, p.145-151. 2004.

COOPER, S.J.; AL-NASER, H.A. Dopaminergic control of food choice: Contrasting effects of SKF 38393 and quinpirole on high-palatability food preference in the rat. **Neuropharmacology**, 50:953-963. 2006.

CREWS, F.; H.E.J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacol Biochem Behav**. 86:189-99.2007.

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

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia**, 20: 398-399. 1964.

DAUNCEY, M.J.; BICKNELL, R.J. Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life. **Nutr Res Rev**, v.12, n.2, p.231-53. 1999.

DELAHAYE, F. et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. **Endocrinology**, 149:470-5. 2008.

DE OLIVEIRA, L. M.; ALMEIDA, S. S. Effects of Malnutrition and Environment on the acquisition an extinction of avoidance behavior in rats. **Psychology and Behavior**, 34:141-145. 1993.

DO MONTE-SILVA, K.K. et al. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. **Nutr Neurosci.** 10(3-4):187-94. 2007.

DOBBING, J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v.159, Feb 18, p.503-9. 1964.

DURAN, P. et al. Prenatal malnutrition and sleep states in adult rats: Effects of restraint stress, **Physiology and behavior**, 89:156 – 163. 2006.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 97:61-73. 2005.

ESTEVINHO, M.F.; FORTUNATO, J.M.S. Dopamina e Receptores. **Revista Portuguesa Psicossomática**, 5:21-31, 2003.

FALLON, J. H.; KOZIELL, D. A.; MOORE, R. Y. Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. **J.Comp Neurol**, 180: 509-532.1978.

FALLON, J. H.; MOORE, R. Y. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. **J. Comp. Neurol**, 180: 545-580. 1978.

FIACCO, T.A. et al. Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. **J Comp Neurol**, 456:350-60. 2003.

FIGLEWICZ, D.P.; BENOIT, S.C. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, 296:9–19. 2009.

_____; SIPOLS, A.J. Energy regulatory signals and food reward. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 97: 15-24. 2010.

FRIELING, H. et al. Epigenetic dysregulation of dopaminergic genes in eating disorders. **International Journal Eating Disorders**. 43: 7 577- 83 2010.

FUKUDA, M. T. H.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behavioral Brain Research**, v. 133, p. 271-277, 2002.

GAMBARANA, C. et al. Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. **Neuroscience**. 121:179-87. 2003.

GARCÍA, A.P. et al. Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. **Diabetes Obes Metab**, 12:403-13.

GIUGLIANI, E.R. et al. The malnourished children of the urban squatter families: a study in Porto Alegre, Brazil. **J Trop Pediatrics**, 33:198. 1987.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal nutrition and adult disease. **Am J Clin Nutr**, 71:1344S-52S. 2000.

GRANDY, D.K. et al. Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:9175-9179. 1991.

GUIVARC'H, D.; VINCENT, J.D.; VERNIER, P. Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptors in the MMQ prolactin cell line. **Endocrinology**. 139:4213-4221. 1998.

HAJNAL, A.; NORRGREN, R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. **Brain Res**, 904:76-84. 2001.

_____ ; SMITH, G.P.; NORRGREN, R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, 286:31-37. 2004.

HALES, C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ**, 303:1019-22. 1991.

HAO, J.; CABEZA, D.V.; CARR, K.D. Effects of chronic ICV leptin infusion on motor-activating effects of D-amphetamine in food-restricted and ad libitum fed rats. **Physiol. Behav**, 83:377-381. 2004.

HOEBEL, B.G. Brain neurotransmitters in food and drug reward. **Am J Clin Nutr**. 42:1133-50. 1985.

HOFFMANN, A. F.; ZHAO, Q.; HOLMES, G. L. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". **Epilepsy Behav**, 5:873-7. 2004.

HOKFELT, T. et al. Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mesand diencephalon. **Med. Biol**, 54: 427-453. 1976.

HUANG, L. T.; LAI, M. C.; WANG, C. L. Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB (Serine-133) phosphorylation. **Brain Res Dev**, 145:213-8. 2003.

HUANG, X.F. et al. Differential expression of dopamine D2 and D4 receptor and tyrosine hydroxylase mRNA in mice prone, or resistant, to chronic highfat diet-induced obesity. **Molecular Brain Research**. 135:150-61. 2005.

HURD, Y.L.; SUZUKI, M.; SEDVALL, G.C. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. **J Chem Neuroanat**, v.22, p.127-137. 2001.

JACKSON, D.M.; WESTLIND-DANIELSSON, A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. **Pharmacol Ther**. 64:291-370. 1994.

JENNER, P. The rationale for the use of dopamine agonist in Parkinson's disease. **Neurology** 45(Suppl 3):S6-S12. 1995.

- KEHOE, P. et al. Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. **Dev Brain Res**, 132:23-31. 2001.
- KELLEY, A. E.; BERRIDGE K, C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. **J Neurosci**, 22:3306-11. 2002.
- KHAZIPOV, R.; LUHMANN, H.J. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. **Trends Neurosci**. 29:414-18. 2006.
- KUMAR, U.; PATEL, S.C. Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain. **Brain Res**, 1131:187-96. 2007.
- LENARD, N.R.; BERTHOUD, H.R. Central and Peripheral Regulation of Food Intake and Physical Activity: Pathways and Genes. **Obesity (Silver Spring)**, 16:11-22. 2008.
- LEVINE, A.S.; KOTZ, C.M.; GOSNELL, B.A. Sugars and fats: the neurobiology of preference. **J Nutr**. 133:831S-834S. 2003.
- LEVITSKY, D. A.; BARNES, R. H. **Nutrição e interação com o meio ambiente no desenvolvimento comportamental de ratos**: efeitos a longo prazo. Trad. de OLIVEIRA, L. M. 176:68-71.1972.
- LEVITT, M. et al. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. **J Pharmacol Exp Ther**. 148:1-8. 1965.
- LI, Y. et al. High-fat diet decreases tyrosine hydroxylase mRNA expression irrespective of obesity susceptibility in mice. **Brain Research**.1268:181-89. 2009.
- L. M.; ALMEIDA, S. S. Effects of early concurrent protein malnutrition and environmental stimulation on the central nervous system and behavior. **Nutritional Neuroscience**, 1:439-448. 1999.
- LIMA, J. G. et al. Comparison of the effects of lab chow and caseins diets based on body and brain development of rats. **Brazilian Journal Biol. Res**. 26:1069-1076,1993.
- LIVAK, K.J, SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **method. Methods**; 25:402-408. [PubMed: 11846609]. 2001.
- LUCAS A. Programming not metabolic imprinting. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71:602. 2000.
- LUK, K.C.; SADIKOT, A.F. Glutamate and regulation of proliferation in the developing mammalian telencephalon. **Dev Neurosci**, 26:218-228. 2004.
- LUTTER, M.; ERIC,J.N. Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. **The Journal of Nutrition**,139:629-632. 2009.
- MATHES, W.F.; NEHRENBERG, D.L. Dopaminergic dysregulation in mice selectively bred for excessive exercise or obesity. **Behav Brain Res**, 210:155-63. 2010.

McELVAIN, J.S.; SCHENK, J.O. A multisubstrate mechanism of striatal dopamine uptake and its inhibition by cocaine. **Biochemistry Pharmacology** 43: 2189-2199, 1992.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol Rev.** 78:189-225. 1998.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE R.J. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, 17:91-128. 1993.

_____. et al. Malnutrition and the developing central nervous system. In: Isaacson, RL, Jensen KF, editors. The vulnerable brain: nutrition and toxins. New York: **Plenum Publishing Corporation**. p. 3–44. 1992.

_____. Et al. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, 26: 471-83. 2002.

MUHLHAUSLER, B.S. et al. Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. **FASEB J**, 20:1257-9. 2006.

NAGATSU, T., LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. Tyrosine hydroxylase. the initial step in norepinephrine biosynthesis. **J Biol Chem.** 239:2910-2917. 1964.

NAKANO, M. et al. Molecular cloning of bullfrog D2 dopamine receptor cDNA: Tissue distribution of three isoforms of D2 dopamine receptor mRNA. **Gen Comp Endocrinol**, 168:143-8. 2010.

NESTLER, E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat Rev Neurosci**, v.2, p.119–28. 2001.

NUNES M.L. Desnutrição e desenvolvimento neuropsicomotor. **Jornal de Pediatria.** 77(3): p. 159-60. 2001.

ODA, S., FUNATO, H. Dopamine D5 receptor immunoreactivity is differentially distributed in GABAergic interneurons and pyramidal cells in the rat medial prefrontal cortex. **Brain Res**, v.6, Mai, p.1329:89. 2010.

PADOIM, M.J.; CADORE, L.P. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behav. Neurosci**, v.115, p.1332–1340. 2001.

PIERCE, R.C.; KALIVAS, D.W. Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. **Journal of Neuroscience**, 17:3254-3262, 1997.

PLOJ, K.; NYLANDER, I. Long-term effects on brain opioid and opioid receptor like-1 receptors after short periods of maternal separation in rats. **Neurosci Lett**, 345:195–7. 2003.

SANTIAGO, M.; MACHADO, A.; CANO, J. Dopamine release and its regulation in the CNS. In: CNS Neurotransmitters and Modulators. Dopamine. Stone T.W. (ed). **CRC Press**, pp. 41-64, 1996.

SANTUCCI, L. B. et al. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour.** V 49, n. 2, p. 393-398, 1994.

SIBLEY, D.R.; MONSMA, F.J.JR. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends Pharmacol Sci** 13,61-69. 1992.

SIEGEL, G. et al. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. **American Society for Neurochemistry-Academic Press**. 7 edition Nov 14:1016 pages 2005.

SILVA, M. S. P.; DE OLIVEIRA, L. M. Desnutrição e níveis de aminas biogênicas no sistema nervoso central. **Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.** V. 79, p. 75-97, 2005.

SILVEIRA, P.P.; PORTELLA, A.K. Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. **Physiology e Behavior**, v.93, p.877-882. 2008.

_____. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. **Physiol Behav**, v.80, p.739-45. 2004.

_____. Et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. **Int J Dev Neurosci**. 28:111-8. 2010.

_____. Et al. Satiety assessment in neonatally handled rats. **Behav Brain Res**.173:205-10. 2006.

SMALL, D.M.; ZATORRE, R.J. Changes in brain activity related to eating chocolate. From pleasure to aversion. **Brain**, v.124, p.1720:1733. 2001.

STEIN, L.;BELLUZZI; J.D. Second messenger, natural rewards, and drugs of abuse. **Clinical Neuropharmacology** 9(Suppl. 4):205-209. 1986.

STONE, T.W. CNS Neurotransmitters and Modulators.Dopamine. **CRC Press**, 1996.

TARAZI, F.I. Neuropharmacology of dopamine receptors: Implications in neuropsychiatric diseases. **SQU Journal For Scientific Research Medical Sciences**, v.3, p.87-104. 2001.

TEJEDOR-REAL P, COSTELA C, GIBERT-RAHOLA J. Neonatal handling reduces emotional reactivity and susceptibility to learned helplessness. Involvement of catecholaminergic systems, **Life Sci**. 62(1):37-50, 1998.

UNICEF **The State Of The World's Children**, Unicef, 2007.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev**, v.24, p.125-132. 2000.

VANDESOMPELE, J.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Elimination of primerdimer artifacts and genomic coamplification using a twostep SYBR Green I real-time RT-PCR. **Anal Biochem**. 303:95-98. 2002.

VICKERS, M.H.; BREIER, B.H. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v.279, p.83-87. 2000.

VOLKOW, N.D.; WANG, G. Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: Possible contributing factors. **Neuroimage**, v.42, n.4, Out, p.1537–1543. 2008.

WATTS, R.L. The role of dopamine agonists in the early Parkinson's disease. **Neurology**, 49:S34-S48. 1997.

WHO. Global Database on Child Growth and Malnutrition, 2000.

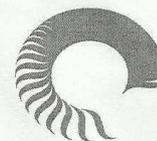
WOLTERS, E.C. The role of D1 and D2 dopamine receptors in motor behavior of patients with Parkinson's disease. **Eur J Neurol**. 3 (Suppl 1):19-24. 1996.

ZENG, C.; ARMANDO, I. Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v.294, p.551-569, 2008.

ZHU, H. et al. Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D1–D5) in the mouse lumbar spinal cord: a real-time polymerase chain reaction and nonautoradiographic in situ hybridization study. **Neuroscience**, v.149, p.885–897. 2007.

ANEXOS

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 30 de setembro de 2010.

Ofício nº 317/10

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof.ª: Sandra Lopes de Souza**
 Departamento: Departamento de Anatomia
 Processo nº 23076.034632/2010-79

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***“Efeito do agonista dopaminérgico D1 no comportamento alimentar de ratos programados nutricionalmente durante o período perinatal.”***

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Atenciosamente,

Observação: Origem dos animais: Biotério de Nutrição da UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos; Idade: 1(um) à 120(cento e vinte) dias; Nº de Animais previsto no projeto: 80(oitenta) ratos.



Prof.ª Maria Teresa Jansen
 Presidente do CEUA

**REVISTA NEUROBIOLOGIA**

NEUROBIOLOGIA JOURNAL

www.neurobiologia.org



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o artigo original intitulado: **EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA INGESTÃO ALIMENTAR – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**, de autoria de Gilvanildo Roberto da Silva¹, Sandra Lopes de Souza e Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, foi aceito para publicação na **REVISTA NEUROBIOLOGIA**, no vol. 76 (1-2) de 2013. Sem mais para o momento.

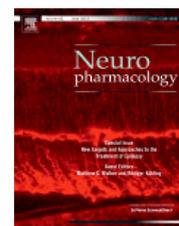
Recife/PE, 11 de abril de 2013.

Prof. Dr. Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos

Editor Assistente



NEUROPHARMACOLOGY



AUTHOR INFORMATION PACK

ISSN: 0028-3908

IMPACT FACTOR

2011: 4.814 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

Editor -in Chief

Bruno Frenguelli, School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK

GUIDE FOR AUTHORS

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above.

Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peerreviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via email (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Exceptions: It is the policy of Elsevier that authors need not obtain permission in the following cases only: (1) to use their original figures or tables in their future works; (2) to make copies of their papers for use in their classroom teaching; and (3) to include their papers as part of their dissertations

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of your submission.

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons

user licenses:

Creative Commons Attribution (CC-BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC-BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC-BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is \$2200, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our **customer support site** <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

The Neuroscience Peer Review Consortium Neuropharmacology is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers.

It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results. If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can now submit the manuscript to Neuropharmacology and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the Editors of Neuropharmacology.

N.B. Only manuscripts which were first submitted to another journal after the 1st January 2008 are eligible for the NPRC scheme. It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to Neuropharmacology. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to Neuropharmacology without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors.

However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to Neuropharmacology's specification and submit the paper to Neuropharmacology with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that they are happy for referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. Authors will be asked upon submission to Neuropharmacology the title of the first journal submitted to and the manuscript ID that was given by that journal.

The editorial office of Neuropharmacology will request the referees' reports from the first journal. The Editors of Neuropharmacology will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold

face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Experimental procedures

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Manuscripts should be accompanied by a statement that all efforts were made to minimise animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilise alternatives to in vivo techniques, if available. Authors are advised to consult A fair press for animals [New Scientist (1992) 1816: 1830] before preparing their manuscript. The Editors reserve the right to reject papers if there is doubt whether suitable procedures have been used.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title. Concise and informative.** Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon

abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

For all accepted manuscripts, page proofs will be sent to the corresponding author (or the firstnamed author) for checking. Corrections to the proofs must be restricted to printer's errors. Any substantial alterations other than these may be charged to the author. Authors are particularly requested to return their corrected proofs as quickly as possible in order to facilitate rapid publication. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, since late corrections cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal.

Reprints and copies of the issue (at a specially reduced rate) can be ordered on the form which will accompany the proofs. These should be returned to: Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, U.K. Disclaimer: Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.