

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

GABRIEL ARAÚJO TAVARES

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE O CONTROLE SEROTONINÉRGICO
DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS**

RECIFE

2018

GABRIEL ARAÚJO TAVARES

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE O CONTROLE SEROTONINÉRGICO
DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS**

Dissertação de Mestrado da área de Bases Experimentais da Nutrição apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientação: Prof^a Dr^a Sandra Lopes de Souza

RECIFE

2018

Catálogo na Fonte

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

T231e Tavares, Gabriel Araújo.

Efeitos do desmame precoce sobre o controle serotoninérgico do comportamento alimentar em ratos / Gabriel Araújo Tavares. – 2018.

59 f. : il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Desmame precoce. 2. Serotonina. 3. Comportamento alimentar. 4. Fenfluramina. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-185)

GABRIEL ARAÚJO TAVARES

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE O CONTROLE SEROTONINÉRGICO
DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS**

Dissertação de Mestrado da área de Bases Experimentais da Nutrição apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada pela banca examinadora em 01 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Lisiane dos Santos Oliveira

Profª Drª Cláudia Jacques Lagranha

Profª Drª Lívia de Almeida Lira Falcão

Dedico este trabalho ao grupo de pesquisa Neuroplasticidade e comportamento.

AGRADECIMENTOS

Não poderia começar os agradecimentos sem agradecer à minha mãe, Carmen. Acho que de toda a dissertação, essa foi a parte que mais me faltou palavras para escrever. Mamãe sempre esteve ao meu lado, sempre acreditou em mim, sempre investiu em mim, o que com certeza fez com que eu estivesse onde estou hoje. Nos momentos mais difíceis pelos quais eu já passei, mamãe foi a primeira e uma das únicas pessoas que me abraçou e disse que me amaria seja lá o que eu fosse e seja lá o que eu quisesse ser da minha vida. Até algum tempo atrás, eu ainda perdia muito tempo olhando para as coisas que eu ainda achava que faltava, que ela poderia ter feito melhor, mas hoje, escrevendo isso aqui, eu vejo que ela me deu tudo, tudo e mais um pouco, ela não poderia ter feito melhor, não poderia ter sido uma mãe melhor. Sem dúvida alguma ela é a razão desse sonho ter se tornado realidade, por isso sou e serei eternamente grato a ela.

Agradeço também à Larissa e Julliet, minhas colegas pós-graduandas e agora amigas que tanto me ensinaram e dividiram o seu dia-a-dia comigo de uma forma que faziam parecer que aquilo nem era um trabalho. Passei pouco tempo com elas durante o mestrado, já elas estarão concluindo seus projetos e, quem sabe, indo voar. Mas para onde quer que elas voem, elas com certeza estarão guardadas num cantinho bem especial do meu coração. Todos nós precisamos de alguém para segurar nosso mundo quando ele está em eminência de acabar, e elas foram essas pessoas para mim durante essa caminhada, cada uma da sua forma, por isso um muitíssimo obrigado às duas.

E o que seria de um pós-graduando sem excelentes braços direitos, vulgo alunos de iniciação científica? Nanda, Helô, Luana e Victor, alguns de vocês já estão há bastante tempo no laboratório, outros são recém-chegados, mas todos foram de uma responsabilidade e compromisso admirável. Eu admiro de mais vocês como profissionais e tenho um carinho enorme por cada um. Vocês irão longe, tenho certeza disso. Muito obrigado pelo compromisso de vocês com este trabalho e com a ciência.

À prof^a Sandra, só tenho a agradecer. Foram tantos atropelos pelos quais nós já passamos juntos, mas ela estava sempre lá me incentivando e acreditando em mim. Ela acreditou tanto em mim, que comprou os meus planos loucos de uma pessoa ansiosa e entrou nessa comigo, e a gente conseguiu, a gente fez um excelente

trabalho do qual me orgulho imensamente. Prof^a Sandra é uma mulher incrível, uma cientista incrível, uma pessoa inteligentíssima, a pessoa que escolhi confiar minha formação, e ela tem feito isso muito bem. Muito obrigado, professora.

Além dessas pessoas maravilhosas, prof^a Matilde, prof^a Renata, os alunos de IC Paula, Bruna e Gabriel me ajudaram cada um da sua forma e tenho certeza que com as melhores das intenções. Vocês são pessoas que irradiam energias positivas e bons sentimentos. A convivência alegre e a ajuda de vocês fizeram cada dia parecer mais leve. Muito obrigado.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos, Edvaldo, Lucas, prof^a Leopoldina, prof^a Fernanda, Thalita, Juliana, Eveline, Adrielly e Pedro. Todos eles de alguma forma me deram algum suporte quando precisei durante esse tempo. 2017 foi inegavelmente um ano de muito amadurecimento e aprendizado para mim, e uma das maiores lições que tirei dele é que não somos nada sem amigos. Muito obrigado a cada um de vocês. A presença de cada um me sustentou em todos os momentos difíceis.

Gostaria de dedicar um parágrafo de agradecimento à Gabriel. No meio dos meus crescimentos e amadurecimentos em 2017 você estava lá no meio. Você me ajudou bastante a segurar as barras e enfrentar minhas obrigações com o trabalho. Por mais que a vida tenha guiado nossas vidas para caminhos diferentes, sou muito grato pelo quanto você me fez crescer, pela tua amizade e pelos bons sentimentos que você deixou em mim.

Prof^a Cláudia Lagranha e Rudá Braz, muito obrigado pela contribuição importantíssima para a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente à coordenação do PPG em Nutrição, especialmente prof^a Elizabeth, coordenadora, e às secretárias Cecília e Andréa. As três estavam sempre lá quando precisei, sempre solícitas e sorridentes, dispostas a ajudar. Imagino que nem sempre o dia de vocês estava indo tão bem, afinal vocês exercem funções bem estressantes, mas isso nunca apagou a boa vontade das atitudes de vocês. Sou sinceramente muito grato a cada uma.

Agradeço também ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado durante esse tempo, e à CAPES, que por meio do edital do PROEX auxiliou financeiramente a execução deste projeto e minha participação em eventos científicos.

Por fim, agradeço a Deus, ao universo, ou quem quer que seja esse ser superior que com certeza conspirou para que eu conquistasse tudo isso.

A melhor medida é o que vocês fizeram com seu tempo,
como escolheram passar os dias e quem cativaram.

Para mim, essa é a melhor medida do sucesso.

Extraordinário, R. J. Palacio

RESUMO

Nos dias atuais, ainda existe uma elevada prevalência de desmame precoce no mundo. Estudos em animais demonstram alterações decorrentes do desmame precoce no comportamento alimentar, como modificações do controle da saciedade. Porém, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares subjacentes a estas alterações comportamentais. Um possível agente envolvido é o sistema de neurotransmissão serotoninérgico, por seu importante papel no controle do comportamento alimentar. Assim, objetivamos avaliar a função do sistema serotoninérgico em ratos desmamados precocemente, a nível comportamental e molecular. Para isso ratos machos e fêmeas foram submetidos a desmame precoce (15 dias de idade) ou desmame natural (30 dias de idade), compondo os grupos desmame machos (DM) e fêmeas (DF) e controle machos (CM) e fêmeas (CF). A evolução de peso corporal dos animais foi avaliada dos 15 aos 40 dias de idade. Durante a adolescência, foram avaliados o ritmo circadiano de alimentação, consumo alimentar em resposta a droga inibidora da receptação de serotonina (fenfluramina) e expressão gênica (PCR em tempo real) dos neuropeptídeos NPY e POMC, dos receptores 5ht1b e 5ht2c e do SERT no hipotálamo, e dos receptores 5ht1b e 5ht2c e do SERT no tronco encefálico. Não houve diferença no percentual de redução de consumo alimentar em resposta a fenfluramina em entre os grupos. Desmame machos apresentaram aumento da expressão gênica de NPY no hipotálamo, quando comparados a controle machos (CM, $1,0 \pm 0,14$, n=5; DM, $1,74 \pm 1,14$, n=4, $p < 0,05$). Desmame fêmeas apresentaram diminuição da expressão gênica de NPY (CF, $2,63 \pm 0,22$, n=4; DF, $0,50 \pm 0,21$, n=4, $p < 0,0001$), POMC (CF, $1,19 \pm 0,23$, n=4; DF, $0,21 \pm 0,21$, n=4, $p < 0,05$), 5ht1b (CF, $1,45 \pm 0,19$, n=5; DF, $0,23 \pm 0,26$, n=4, $p < 0,001$), e SERT (CF, $1,09 \pm 0,20$, n=4; DF, $0,347 \pm 0,22$, n=4, $p < 0,05$) no hipotálamo e aumento da expressão gênica de 5ht1b (CF, $1,07 \pm 0,16$, n=5; DF, $2,18 \pm 0,06$, n=4, $p < 0,005$) e SERT (CF, $1,79 \pm 0,21$, n=5; DF, $4,57 \pm 0,23$, n=6, $p < 0,0001$) no tronco encefálico, quando comparadas à controle fêmeas. Assim, o desmame precoce promoveu modificações no controle do comportamento alimentar de uma forma dependente do sexo.

Palavras-chave: Desmame precoce. Serotonina. Comportamento alimentar. Fenfluramina.

ABSTRACT

Early weaning remains with high prevalence worldwide. Animal studies demonstrate several behavioral changes resulting from early weaning, such as changes in feeding behavior, resulting in changes in satiety control. But little is known about the molecular mechanisms behind these behavioral changes. One of the neurotransmission systems that could be behind this is the serotonergic, since it has an active role in controlling eating behavior. Thus, we aimed to evaluate the role of the serotonergic system in rats prematurely weaned at behavioral and molecular level. For this, male and female rats were submitted to early weaning (15 days of age) or natural weaning (30 days of age), forming the groups early weaning male (DM) and female (DF) and control male (CM) and female (CF). The evolution of the animals' body weight was evaluated from 15 to 40 days of age. During adolescence, the circadian rhythm of feeding, food intake in response to the serotonin reuptake inhibitor (fenfluramine) and gene expression (real time PCR) of NPY and POMC neuropeptides, 5ht1b and 5ht2c receptors, and SERT in the hypothalamus, and the 5ht1b and 5ht2c receptors and the SERT in the brainstem were evaluated. There was no difference in the percentage of food consumption reduction in response to fenfluramine in both groups. D males showed increased NPY expression in the hypothalamus when compared to C males (CM, $1,0 \pm 0,14$, $n=5$; DM, $1,74 \pm 1,14$, $n=4$, $p<0,05$). D females decreased the gene expression of NPY (CF, $2,63 \pm 0,22$, $n=4$; DF, $0,50 \pm 0,21$, $n=4$, $p<0,0001$), POMC (CF, $1,19 \pm 0,23$, $n=4$; DF, $0,21 \pm 0,21$, $n=4$, $p<0,05$), 5ht1b (CF, $1,45 \pm 0,19$, $n=5$; DF, $0,23 \pm 0,26$, $n=4$, $p<0,001$), and SERT (CF, $1,79 \pm 0,21$, $n=5$; DF, $4,57 \pm 0,23$, $n=6$, $p<0,0001$) in hypothalamus and increased the gene expression of 5ht1b (CF, $1,07 \pm 0,16$, $n=5$; DF, $2,18 \pm 0,06$, $n=4$, $p<0,005$) e SERT (CF, $1,79 \pm 0,21$, $n=5$; DF, $4,57 \pm 0,23$, $n=6$, $p<0,0001$) in the brainstem, when compared to C females. Thus, early weaning promoted changes in feeding behavior control in a sex-dependent manner.

Key words: Early weaning. Serotonin. Feeding behavior. Fenfluramine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mecanismo de ação inibitória da serotonina sobre o comportamento alimentar no núcleo arqueado do hipotálamo.....	20
FIGURA 2 - Áreas encefálicas relacionadas com o componente hedônico do comportamento alimentar.....	21
FIGURA 3 - Esquema metodológico do desmame precoce adotado neste estudo.....	27
FIGURA 4 - Esquema de grupos experimentais.....	28
FIGURA 5 - Esquema do teste de consumo alimentar em resposta à aplicação aguda de salina ou fenfluramina.....	29
FIGURA 6 - Efeito do desmame precoce sobre o peso corporal de ratos.....	33
FIGURA 7 - Efeito do desmame precoce sobre o ritmo circadiano de alimentação de ratos.....	35
FIGURA 8 - Efeito da injeção aguda de fenfluramina sobre o consumo alimentar de ratos.	37
FIGURA 9 - Efeito do desmame precoce sobre a expressão gênica de componentes do controle do comportamento alimentar no hipotálamo.....	39
FIGURA 10 - Efeito do desmame precoce sobre a expressão gênica de componentes do controle do comportamento alimentar no tronco encefálico.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Desenho e número de referência dos primers utilizados no estudo.....	30
--	-----------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
3	HIPÓTESE	24
4	OBJETIVOS	25
5	MÉTODOS	26
5.1	Animais experimentais	26
5.2	Desmame precoce	26
5.3	Fármaco	27
5.4	Grupos Experimentais	27
5.5	Evolução ponderal e percentual de ganho de peso	28
5.6	Ritmo circadiano de alimentação	28
5.7	Consumo alimentar após injeção de fenfluramina	29
5.8	PCR em tempo real	29
5.9	Aspectos éticos	31
5.10	Análises estatísticas	31
6	RESULTADOS	32
6.1	Peso corporal	32
6.2	Ritmo de alimentação	34
6.3	Consumo alimentar em resposta à fenfluramina	36
6.4	Expressão gênica de peptídeos, transportador e receptores da 5-HT	38
7	DISCUSSÃO	41
8	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A – Parecer do comitê de ética	59

1 INTRODUÇÃO

Um ambiente saudável do início da vida é de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento de qualquer indivíduo. Em períodos precoces da vida, como a gestação e lactação, o sistema nervoso apresenta um rápido crescimento, denominado de período crítico do desenvolvimento (MORGANE et al., 1993). Neste, o sistema nervoso tem elevada plasticidade, o que o torna adaptativo as informações ambientais (MORGANE et al., 1978). No entanto, quando este ambiente é adverso, o desenvolvimento morfofuncional do sistema nervoso pode ser prejudicado, gerando alterações comportamentais, fisiológicas e metabólicas nos indivíduos, que podem perdurar ao longo da vida (JUAN DE SOLIS et al., 2016). As agressões ambientais podem ser nutricionais, de estresse, farmacológicas, entre outras (LEE; CLIFTON, 1992; MOUSSAOUI et al., 2017; ROOIJ et al., 2015). Os estudos sobre as repercussões tardias da exposição a ambiente adverso no período inicial da vida, tem apontado importantes prejuízos a saúde quando o ambiente nutricional não é adequado, dentre elas alterações de comportamento alimentar, resposta a fármacos e ao estresse, por exemplo (AHOLA; VAPALAHTI, 2017; FERRO CAVALCANTE et al., 2016; JUAN DE SOLIS et al., 2016; MOGI et al., 2016; OROZCO-SÓLIS et al., 2009). Um dos principais eventos nutricionais que ocorrem nesse período é o aleitamento materno, no qual a mãe dispõe o aporte nutricional e contato necessário para o crescimento e desenvolvimento do filho (KIKUSUI; MORI, 2009).

A amamentação é definida como a provisão de leite materno para o neonato, independentemente da forma de sua oferta, seja direta ou indireta (OMS, 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o aleitamento materno exclusivo durante os seis primeiros meses de vida, com a continuação desse processo associado à introdução de outros alimentos até os dois anos de idade ou mais (PANG et al., 2017; WHO, 2008). Ainda que a prevalência de aleitamento materno exclusivo venha crescendo gradativamente em alguns países, os números ainda estão muito aquém do esperado. Nos Estados Unidos da América, das crianças nascidas em 2014, apenas 24,9% receberam aleitamento materno exclusivo durante os 6 primeiros meses de vida (CDC, USA, 2014). Na Austrália, esse número foi de 24,7%, entre os anos de 2014 e 2015 (ABS, AU, 2015). No Brasil, de acordo com a II Pesquisa de Prevalência do Aleitamento Materno, realizada em 2008, existe apenas 9,3% de

probabilidade de crianças estarem em aleitamento materno exclusivo aos seis meses de vida. Para esta mesma avaliação, a Região Nordeste do Brasil apresentou o pior desempenho, com apenas 8,4%, seguida da Região Centro-Oeste com 9,3%, Região Sudeste com 9,3%, Região Sul com 9,9% e Região Norte com 10,1% (BRASIL, 2009). Estes dados indicam que no Brasil há elevada prevalência de interrupção do aleitamento materno exclusivo antes da idade adequada ao bom desenvolvimento da criança. A OMS define a interrupção do aleitamento materno exclusivo antes dos seis primeiros meses de vida como desmame precoce (WHO, 2008). Em animais de laboratório, particularmente roedores, o desmame precoce ocorre quando há separação definitiva entre a mãe e o filhote antes do término do tempo natural de aleitamento, por volta dos dias 15 à 18 de idade (AHOLA; VAPALAHTI, 2017; NOVÁKOVÁ et al., 1962).

Animais desmamados precocemente apresentam na vida adulta comportamentos emocionais semelhantes à ansiedade, à depressão, e demonstram maior resposta ao estresse (KANARI et al., 2005; MOGI et al., 2016; SHIMOZURU et al., 2007). Quando adultos, ratos desmamados precocemente apresentam modificações no controle do comportamento alimentar, com retardo do início da saciedade e preferência por alimentos palatáveis (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Porém, são incipientes as informações sobre os possíveis ajustes celulares ou moleculares subjacentes a estas modificações comportamentais.

No sistema nervoso central, um dos sistemas de neurotransmissão que poderia estar envolvido com os ajustes comportamentais promovidos pelo desmame precoce é o serotoninérgico. Este apresenta importante papel no controle do comportamento alimentar (GARFIELD; HEISLER, 2009) e tem se mostrado envolvido nas adaptações de organismos que foram submetidos a um ambiente adverso na vida perinatal, a exemplo da hipofunção de receptores 5ht1b em animais desnutridos (FERRO CAVALCANTE et al., 2016; LOPES DE SOUZA et al., 2008b; SPENCER; DENERIS, 2017).

Investigações acerca dos ajustes do comportamento alimentar em resposta ao desmame precoce e suas possíveis bases celulares e moleculares são de grande relevância. Assim, o presente trabalho objetiva investigar o papel do sistema de neurotransmissão serotoninérgico nos ajustes do comportamento alimentar de ratos desmamados precocemente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Um ambiente adequado no início da vida é de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento adequado dos indivíduos (DOBBING, 1990; MORGANE et al., 1993). Isto porque é nos períodos iniciais da vida de mamíferos que seu sistema nervoso central (SNC) encontra-se em seu ápice de desenvolvimento morfológico e funcional (MORGANE et al., 1993). Este período inicial da vida pode ser dividido em três fases de igual importância em mamíferos altriciais, sendo elas o período pré-natal, que compreende as fases embrionária e fetal do desenvolvimento; o período pós-natal, que compreende as fases de amamentação e infância; e o período perinatal, que compreende as fases de gestação e lactação (MORGANE et al., 1993).

Inicialmente, Dobbing e seus colaboradores caracterizaram o período de maior suscetibilidade do SNC a agressões como aquele que coincide com o de maior pico de crescimento cerebral em massa, quando ocorrem processos de desenvolvimento que são vulneráveis a insultos sejam nutricionais ou de outra natureza (DOBBING, 1990). Como em roedores o período em que ocorre maior crescimento de massa encefálica é na fase pós-natal, segundo Dobbing esse seria o período de maior vulnerabilidade do SNC a agressões (DOBBING, 1990). Em seus estudos ele demonstrou que o aporte nutricional nesse período foi capaz de determinar o tamanho e massa encefálica da prole, demonstrando que essa é uma fase bastante suscetível a insultos, como a desnutrição (DOBBING; SANDS, 1971). O que faz esse sistema ser tão vulnerável nas fases iniciais da vida é o fato de ele ser formado por uma delicada e complexa rede neuronal envolvendo diversos sistemas de neurotransmissão e áreas distintas do SNC, que estão sendo formadas justamente no período de vulnerabilidade deste sistema (BOURET, 2017; SOUSA-FERREIRA; ALMEIDA; CAVADAS, 2014; ZELTSER; SEELEY; TSCHÖP, 2012)

Diversos estudos realizados a partir da metade do século passado demonstraram como o SNC é vulnerável a agressões durante essas fases do desenvolvimento, particularmente apresentadas como alterações comportamentais (ALTMAN; DAS; SUDARSHAN, 1970; DOBBING; HOPEWELL; LYNCH, 1971; MASSARO; LEVITSKY; BARNES, 1977). Um dos principais modelos de insultos precoces utilizados através de décadas, foi o de desnutrição protética (ALTMAN; DAS; SUDARSHAN, 1970; MORGANE et al., 1985; SMART; DOBBING, 1971). Dieta

hipoprotéica durante uma ou mais das fases iniciais de desenvolvimento desencadeou na vida adulta obesidade, aumento do tamanho da refeição, modificações na maturação do hipotálamo, alterações na distribuição de peptídeos que controlam o comportamento alimentar, entre outros (JUAN DE SOLIS et al., 2016; LIRA et al., 2014; OROZCO-SÓLIS et al., 2009; ROCHA et al., 2014)

Porém, durante cada fase inicial do desenvolvimento, processos distintos estão ocorrendo na formação morfológica e funcional do SNC (MORGANE et al., 1993). Durante a fase pré-natal há maior proliferação e diferenciação de macroneurônios, sendo a maior proliferação e diferenciação dos microneurônios na fase pós-natal (amamentação) e o pico de proliferação e diferenciação da glia ocorrendo por volta do período de desmame (MORGANE et al., 1993). A partir disto, Morgane definiu um período de vulnerabilidade do SNC à agressões não só como o momento em que há maior crescimento em massa, mas compreendendo todas as fases iniciais do desenvolvimento (MORGANE et al., 1993). Este mesmo autor e seu grupo realizaram diversos estudos com o modelo de desnutrição protéica em cada uma das fases de desenvolvimento, e demonstraram que, em todas elas, este insulto foi capaz de promover alterações morfofuncionais permanentes no SNC sem necessariamente alterar a sua macroestrutura (MORGANE et al., 1978, 1985; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Como o sistema nervoso é responsável pela coordenação de todos os comportamentos de mamíferos, insultos no seu período de crescimento e desenvolvimento, promovendo alterações de sua morfologia e função, podem resultar em alterações comportamentais a longo prazo (ALTMAN; DAS; SUDARSHAN, 1970; BANQUERI; MENDEZ; ARIAS, 2017; FRANSEN et al., 2016; LAHTI et al., 2017; ROCHA et al., 2014).

Um dos comportamentos que sofre modificações no seu controle por exposição a agressões no início da vida é o alimentar (DA SILVA et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018; DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; FERRO CAVALCANTE et al., 2016; JUAN DE SOLIS et al., 2016; LIRA et al., 2014). Tais modificações têm sido muito investigadas pela associação com o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, na maioria provenientes de maior consumo alimentar (ALVES et al., 2015; CAMACHO et al., 2017; LIRA et al., 2014; ROCHA et al., 2014). Dentre estas modificações estão a elevada preferência por alimentos palatáveis, redução da saciedade, hiperfagia e outros (BELLINGER; LILLEY; LANGLEY-EVANS, 2007; DOS

SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; LIRA et al., 2014; LOPES DE SOUZA et al., 2008a; OLIVEIRA et al., 2011; RYU et al., 2008; SILVA et al., 2014).

O complexo controle do comportamento alimentar é realizado por interação do SNC com componentes periféricos (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Podem ser identificados dois níveis de controle, um homeostático e outro hedônico. O primeiro está relacionado ao controle da aquisição energética, o segundo a recompensa gerada por consumo de alimentos densamente energéticos (STOJAKOVIC et al., 2017). O hipotálamo é uma das estruturas do SNC mais bem conhecidas no controle homeostático, enquanto o núcleo accumbens, a área tegmentar ventral e a amígdala no controle hedônico (SIMON et al., 2017). No hipotálamo, a maioria das sinalizações de órgãos da periferia são recebidas e integradas (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Entre estas estão hormônios produzidos no trato gastrointestinal e tecido adiposo, bem como nutrientes presentes na corrente sanguínea (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). No trato gastrointestinal são liberados em resposta ao consumo alimentar, entre outros, o peptídeo YY (PYY), a colecistoquinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) e a insulina (D'AGOSTINO et al., 2016; YOUNG, 2012). Estas substâncias sinalizam saciedade no SNC (SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Até o momento, o único hormônio periférico que sinaliza fome ao SNC é a ghrelina, produzida no estômago (ZANCHI et al., 2017).

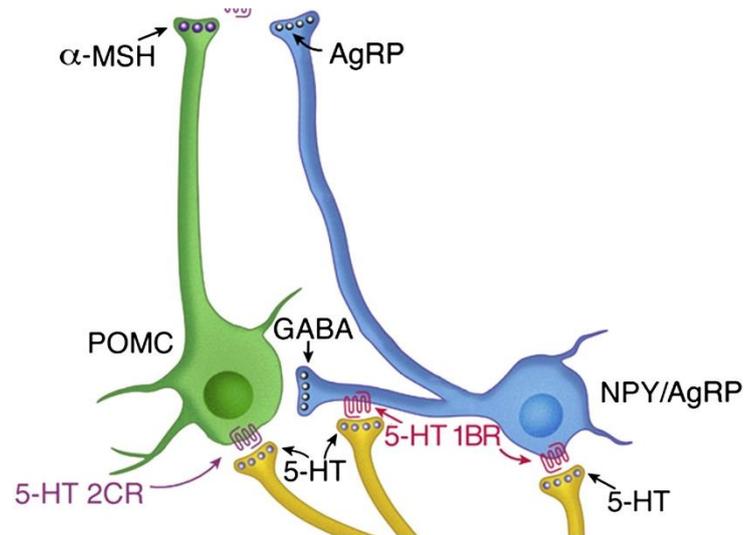
O tecido adiposo produz a leptina e as adiponectinas, que apresentam ação anorexigênica no SNC (ABDALLA, 2017). A leptina é liberada em resposta ao aumento do estoque energético no tecido adiposo, e estimula a saciedade no SNC (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Camundongos sem produção de leptina ou de seu receptor, apresentam fenótipo de obesidade (MONTAGUE et al., 1997). Alguns nutrientes presentes na corrente sanguínea também exercem função de sinalizadores do balanço energético, como é o caso da glicose, que sinaliza saciedade no SNC (BARAHONA et al., 2017). A produção e disponibilidade dessas substâncias tem o objetivo de informar ao SNC sobre o estado energético do organismo, estimulando a liberação de sinalizadores anorexigênicos no balanço positivo, e orexigênicos no balanço negativo (ABDALLA, 2017).

O hipotálamo é uma das principais regiões encefálicas responsáveis pela regulação da homeostase energética (ABDALLA, 2017). Seus diferentes núcleos contribuem de forma complementar para o controle do comportamento alimentar. O

grande volume de achados científicos está sobre o núcleo arqueado (ARQ). Neste núcleo localizam-se populações neuronais orexígenas, que produzem o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao gene agouti (AgRP) e anorexígenas, que produzem a pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado a cocaína e anfetamina (CART) (VOIGT; FINK, 2015). As sinalizações das substâncias periféricas no ARQ, quando orexigênicas, estimulam as populações neuronais NPY e AgRP a produzirem e secretarem seus peptídeos e inibem os neurônios POMC e CART, porém, quando a sinalização é anorexígena, os neurônios POMC e CART são ativados para inibir a ingestão alimentar e os neurônios NPY e AgRP inibidos (ABDALLA, 2017; SCHWARTZ; ZELTSER, 2013). Recentemente, foi descrito no núcleo arqueado, uma população neuronal produzindo tirosina hidroxilase e que estimula positivamente a homeostase energética (ZHANG and POL, 2016). Após a interpretação dos sinais, o ARQ projeta axônios para outros núcleos hipotalâmicos para que haja a efetivação da fome ou da saciedade (ABDALLA, 2017).

No SNC, o controle do comportamento alimentar envolve diversas estruturas e substâncias. Os sistemas de neurotransmissão possuem diferentes papéis. Entre estes, o sistema serotoninérgico tem sido extensivamente relacionado ao controle do comportamento alimentar (CARRUBA et al., 1986; GARFIELD; HEISLER, 2009; SCHWARTZ; ZELTSER, 2013; VOIGT; FINK, 2015). A serotonina é produzida nos núcleos da rafe do tronco encefálico a partir do aminoácido triptofano (SPENCER; DENERIS, 2017). Os neurônios serotoninérgicos emitem projeções axonais para todo o encéfalo (ISHIWATA; HASEGAWA; GREENWOOD, 2017). A liberação de serotonina por estas projeções é regulada pelo transportador de serotonina (SERT) e por auto receptores em neurônios pré-sinápticos (VOIGT; FINK, 2015). O SERT transporta a serotonina de volta para o citoplasma do neurônio pré-sináptico, exercendo feedback negativo e inibindo sua liberação (SPENCER; DENERIS, 2017). Os receptores para serotonina são classificados em 7 famílias e distribuídos em 14 subtipos, cada um com ações específicas (PALACIOS, 2015).

Quando liberada no ARQ, a serotonina estimula a saciedade. Neste núcleo, a serotonina se liga a receptores 5ht1b localizados nos neurônios NPY/AgRP, promovendo sua inibição, ou seja, inibe a fome (VOIGT; FINK, 2015). Por outro lado, quando se liga aos receptores 5ht2c nos neurônios POMC/CART, promove sua ativação e conseqüentemente estimula a saciedade (VOIGT; FINK, 2015).



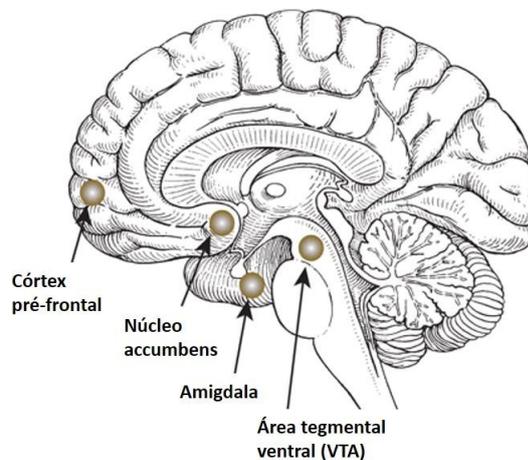
Fonte: Heisler et al. (2006)

FIGURA 1. Mecanismo de ação inibitória da serotonina sobre o comportamento alimentar no núcleo arqueado do hipotálamo. A serotonina inibe os neurônios AgRP e reduz a sinalização inibitória nos neurônios POMC através da ativação dos receptores 5ht1b. Além disso a serotonina também ativa os neurônios POMC através dos receptores 5ht2c. O resultado dessas ações é o aumento da sinalização anorexígena e diminuição da sinalização orexígena. 5HT – serotonina, POMC – Neurônios pró-ópiomelanocortina, NPY/AgRP – Neurônios produtores de neuropeptídeo Y e gene relacionado ao peptídeo agouti.

Devido à sua ação inibitória sobre a ingestão alimentar, o sistema serotoninérgico é alvo para tratamento farmacológico de distúrbios alimentares (GARFIELD; HEISLER, 2009). Dentre os fármacos serotoninérgicos utilizados para a inibição da ingestão alimentar estão os antidepressivos inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998). Os ISRS agem impedindo a recaptação da serotonina liberada na fenda sináptica, através do bloqueio do SERT, fazendo com que os níveis de serotonina aumentem (FRIZZO, 2017). O aumento dos níveis extracelulares de serotonina promovem potencialização de sua ação inibitória sobre o comportamento alimentar (BLUNDELL, 1986).

Além da regulação homeostática do comportamento alimentar, que é regida pelo estado energético do indivíduo, outras áreas do SNC regulam a ingestão alimentar com base no valor de recompensa do alimento (HUME; JACHS; MENZIES, 2016). Este valor de recompensa é medido pela palatabilidade e conteúdo energético do alimento (HUME; JACHS; MENZIES, 2016). Os alimentos considerados palatáveis

são aqueles com alta densidade energética, ricos em carboidratos simples, gorduras saturadas e sal (REYNAERT et al., 2015). A presença do alimento palatável tem a capacidade de estimular o apetite em indivíduos que já se encontram em estado de saciedade/saciação. O componente hedônico do comportamento alimentar pode se sobrepor à regulação homeostática e induzir consumo maior que o adequado (BERTHOUD; MÜNZBERG; MORRISON, 2017). Esse consumo excessivo está relacionado a gênese de doenças crônico-degenerativas, como a obesidade, diabetes, hipertensão, dislipidemias e outros (HUME; JACHS; MENZIES, 2016; YI-HAO YU, 2017). O controle desse componente é regido por áreas mesolímbicas, que envolvem o córtex pré-frontal, amígdala, área tegmentar ventral, núcleo accumbens, e outros (BERTHOUD, 2012). Os sistemas de neurotransmissão opioide e dopaminérgico atuando nessas áreas estimulam a recompensa alimentar (BERTHOUD; MÜNZBERG; MORRISON, 2017). Em indivíduos obesos são observadas alterações nesses dois sistemas de neurotransmissão, o que está relacionado com o aumento do consumo alimentar e preferência por alimentos densamente calóricos (TUOMINEN et al., 2015).



Fonte: Bado & Bertolini (2013)

FIGURA 2. Áreas encefálicas relacionadas com o componente hedônico do comportamento alimentar.

A complexidade dos mecanismos do controle do comportamento alimentar ainda não está estabelecida na vida perinatal precoce, o que a deixa vulnerável a agressões ambientais no período perinatal. Vários estudos têm demonstrado que a desnutrição no período perinatal, promove hiperfagia na vida adulta (LOPES DE

SOUZA et al., 2008b). Esta está acompanhada de retardo no disparo de saciedade e maior motivação na busca por alimentos palatáveis (ALVES et al., 2013, 2016; LIRA et al., 2014; LOPES DE SOUZA et al., 2008b). Essas alterações em animais desnutridos parecem estar relacionadas a perturbações na regulação serotoninérgica da saciedade. Foi demonstrado que ratos desnutridos na vida perinatal não reduzem o consumo em resposta a agonista do receptor 5ht1b (LOPES DE SOUZA et al., 2008b). Estes ratos apresentam maior ativação neuronal em áreas hedônicas em resposta a agonista do receptor 5HT6 (DA SILVA et al., 2017). Na vida neonatal, foi observado que desnutridos já apresentam alteração de ativação neuronal em resposta a ISRS em áreas de produção serotoninérgica (FERRO CAVALCANTE et al., 2016).

Além da desnutrição nas fases iniciais da vida, outros modelos de insultos perinatais buscam investigar as repercussões sobre o controle do comportamento alimentar. Um dos modelos é o estresse neonatal por separação materna (EE et al., 2013; GRACIA-RUBIO et al., 2016). Neste modelo, em que a prole é separada da mãe diariamente nos quatorze primeiros dias de vida por três horas, foram observadas diversas alterações de comportamento alimentar na vida adulta (SILVA et al., 2014). Os animais apresentam maior consumo de dieta palatável, maior preferência por glicose, hiperfagia de rebote além de ponto de saciedade adiantado (GRACIA-RUBIO et al., 2016; MICHAELS; HOLTZMAN, 2006; SILVA et al., 2014). Outro modelo de estresse neonatal é o desmame precoce, no qual os filhotes são separados das mães antes da idade adequada do desmame (SHIMOZURU et al., 2007). A interrupção do processo de amamentação acarreta prejuízos a saúde da prole, que pode repercutir à longo prazo (GIBBS; FORSTE, 2013). Camundongos desmamados precocemente apresentam aumento de comportamento de medo em teste de condicionamento ao medo por choque elétrico nas patas, associado à diminuição da expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (MOGI et al., 2016). Em gatos, foi demonstrado que o desmame precoce aumenta o comportamento agressivo em resposta a um agente estressor (AHOLA; VAPALAHTI, 2017). Além disso, ratos desmamados precocemente apresentam aumento de comportamentos semelhantes à ansiedade e diminuição do comportamento de luta amistosa (SHIMOZURU et al., 2007). Um dos comportamentos que é bastante modificado em roedores desmamados precocemente é a resposta a agente estressor (NAKAMURA et al., 2008). Em um teste de agressividade, exposição ao intruso, camundongos desmamados

precocemente apresentaram redução (aproximadamente 50%) de ataques agressivos (NAKAMURA et al., 2008). Por outro lado, quando houve privação alimentar, o desmame precoce promoveu aumento da agressão (NAKAMURA et al., 2008).

Outro comportamento modificado pelo desmame precoce é o alimentar (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011). Ratos desmamados precocemente apresentam retardo do ponto de saciedade, aumentando o tamanho da refeição (OLIVEIRA et al., 2011). O desmame precoce também promoveu, na vida adulta, preferência por dietas palatáveis (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a estes ajustes duradouros no controle do comportamento alimentar ainda são desconhecidos. Um dos mecanismos de controle que pode estar envolvido nesta relação é o sistema de neurotransmissão serotoninérgico, considerando sua susceptibilidade em organismos que foram submetidos a um ambiente adverso na vida perinatal, como descrito anteriormente (FERRO CAVALCANTE et al., 2016; LOPES DE SOUZA et al., 2008b; SPENCER; DENERIS, 2017). Os dados existentes sobre as repercussões do desmame precoce sobre o controle do comportamento alimentar são estritamente comportamentais e em ratos adultos machos. Assim, o presente estudo se propôs a investigar a relação entre o desmame precoce e parâmetros comportamentais da alimentação, bem como a ação do sistema serotoninérgico sobre a saciedade, a expressão gênica de peptídeos, receptores e transportador de serotonina no hipotálamo e tronco encefálico em ratos adolescentes machos e fêmeas.

3 HIPÓTESE

O desmame precoce promove redução da ação da serotonina sobre o consumo alimentar em ratos adolescentes de ambos os sexos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar os efeitos do desmame precoce na ação do sistema serotoninérgico sobre o comportamento alimentar de ratos adolescentes de ambos os sexos.

4.2 Específicos

Analisar, em ratos adolescentes, de ambos os sexos, submetidos ao desmame precoce:

- Evolução de ganho de peso
- Ritmo circadiano de alimentação
- Consumo alimentar após injeção aguda de fenfluramina
- Expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico no tronco encefálico (5ht1b, 5ht2c e SERT).
- Expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico no hipotálamo (5ht1b, 5ht2c e SERT).
- Expressão gênica de peptídeos que participam do controle do comportamento alimentar no hipotálamo (NPY e POMC).

5 MÉTODOS

5.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Inicialmente, ratas (200-250g de peso corporal, n=10) foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozoide no esfregaço vaginal e confirmada pelo ganho de peso corporal. A partir do diagnóstico, as ratas prenhas foram transferidas para gaiolas individuais, e durante a gestação e lactação receberam dieta padrão de biotério (Presence®). Após o nascimento dos filhotes, foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes machos e fêmeas, igualmente proporcional. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições padrão de biotério (temperatura de 22 ± 1 °C, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18h), com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados de acordo com a Comissão de Ética em Utilização de Animais da UFPE, de acordo com número de processo 23076.043927/2014-60.

5.2 Desmame precoce

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado dia zero. No primeiro dia pós-natal, foram mantidos 4 filhotes machos e 4 fêmeas em cada ninhada. Para obtenção dos grupos experimentais, os filhotes de diferentes ninhadas foram desmamados em períodos distintos. O desmame precoce em ratos é considerado quando há interrupção do aleitamento por volta do 15º dia de idade, e o natural, como ocorre na natureza, aos 30 dias de vida (KIKUSUI; MORI, 2009; NOVÁKOVÁ et al., 1962). Após o desmame precoce, os filhotes receberam dieta comercial de biotério triturada até o dia 30 de vida. A partir do 30º dia de vida, todos os grupos foram submetidos a dieta comercial de biotério.

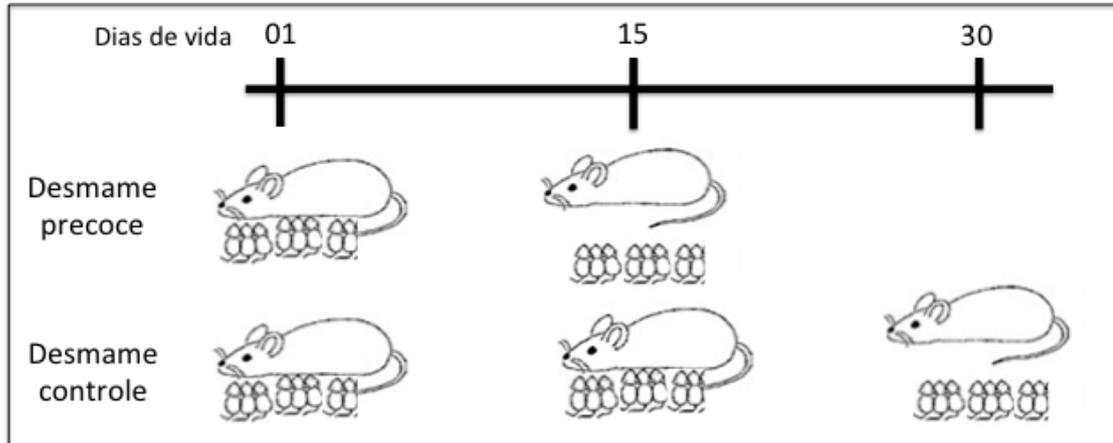


FIGURA 3. Esquema metodológico do desmame precoce adotado neste estudo.

5.3 Fármaco

Neste estudo foi utilizado, em aplicação aguda, um inibidor seletivo da recaptção da serotonina para promoção da saciedade em ratos com idade entre 40 e 50 dias. A droga escolhida foi a d-fenfluramina (SIGMA-Aldrich, USA) na dose de 3mg/kg. Como controle foi utilizada solução salina (Nacl 0,9%). As injeções foram realizadas no volume de 1ml/kg, via intraperitoneal (FERRO CAVALCANTE et al., 2016).

5.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram formados de acordo com o dia do desmame, 15 ou 30 dias pós-natal, e a manipulação farmacológica, salina ou fenfluramina.

Segundo o período do desmame:

- Grupo Controle, macho (CM) ou fêmea (CF) - desmamado no período natural para a espécie, 30º dia pós-natal;
- Grupo desmamado precocemente, macho (DM) ou fêmea (DF) – animais desmamados no 15º dia pós-natal.

Segundo a manipulação farmacológica:

- Grupo controle salina Macho (CMS) ou fêmea (CFS)
- Grupo controle fenfluramina Macho (CMF) ou fêmea (CFF)
- Grupo desmame precoce salina Macho (DMS) ou fêmea (DFS)
- Grupo desmame precoce fenfluramina Macho (DMF) ou fêmea (DFF).

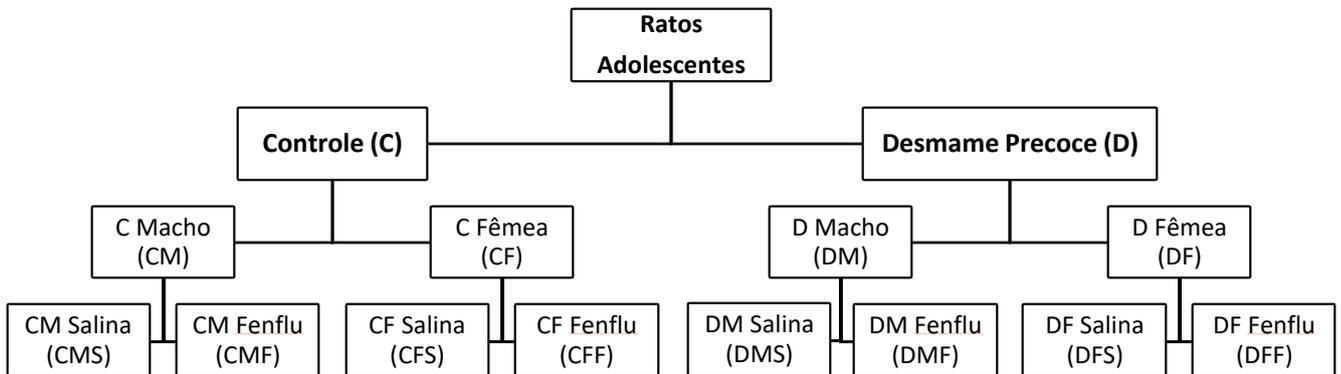


FIGURA 4. Esquema de grupos experimentais do estudo. Os grupos experimentais foram formados segundo o dia do desmame e a manipulação farmacológica. Fenflu (fenfluramina).

5.5 Evolução ponderal e percentual de ganho de peso

O peso corporal dos animais (gramas) foi mensurado nas idades 15, 21, 30, 35 e 40 dias de vida. Até o 30º dia de vida, o peso foi obtido a partir da média de peso de todos os animais de cada ninhada, separados por sexo. A partir do 35º dia, foi obtido o peso individual dos ratos. O percentual de ganho de peso foi mensurado a partir da porcentagem de peso ganho do 15º ao 21º dia de vida, do 21º ao 30º dia de vida e do 15º ao 30º dia de vida (OLIVEIRA et al., 2011).

5.6 Ritmo circadiano de alimentação

Neste estudo, foi avaliado o consumo alimentar dos grupos experimentais durante 24 horas. Para esta análise, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, respeitando 72 horas de aclimação prévia nesta condição. Aos 34 dias de vida, foi mensurado o consumo alimentar de dieta padrão de biotério a cada 4 horas, com início a partir das 08:00 horas. Deste modo, foi obtido o consumo alimentar nos intervalos: 08h as 12h, 12h as 16h, 16h as 20h, 20h as 00h, 00h as 04h, 04h as 08h. O consumo foi obtido a partir da diferença entre o peso de ração ofertada no início de cada intervalo e o peso de ração restante ao final de cada intervalo. A quantidade total ingerida foi considerada o consumo de 24 horas. A quantidade ingerida nos intervalos entre 04h as 08h, 08h as 12h e 12h as 16h foi considerada como consumo na fase escura do ciclo, e nos intervalos restantes como fase clara (OLIVEIRA et al., 2011).

5.7 Consumo alimentar após injeção de fenfluramina

No período da adolescência (entre 40 e 50 dias de vida) dos ratos dos diferentes grupos experimentais, foi analisado o consumo alimentar em resposta a fenfluramina. Ratos foram mantidos previamente em gaiolas individuais por 7 dias consecutivos antes deste estudo. No dia do teste, os animais foram submetidos a privação alimentar de 4 horas. Após 3 horas e 30 minutos foi realizada a injeção de fenfluramina (3mg/Kg; 1mL/Kg, i.p.) ou solução salina (NaCL 0,9%) (1mL/KG pc, i.p.), e após 30 minutos foi ofertada uma quantidade conhecida de ração. O consumo alimentar foi mensurado pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante ao final de uma hora (LOPES DE SOUZA et al., 2008b).

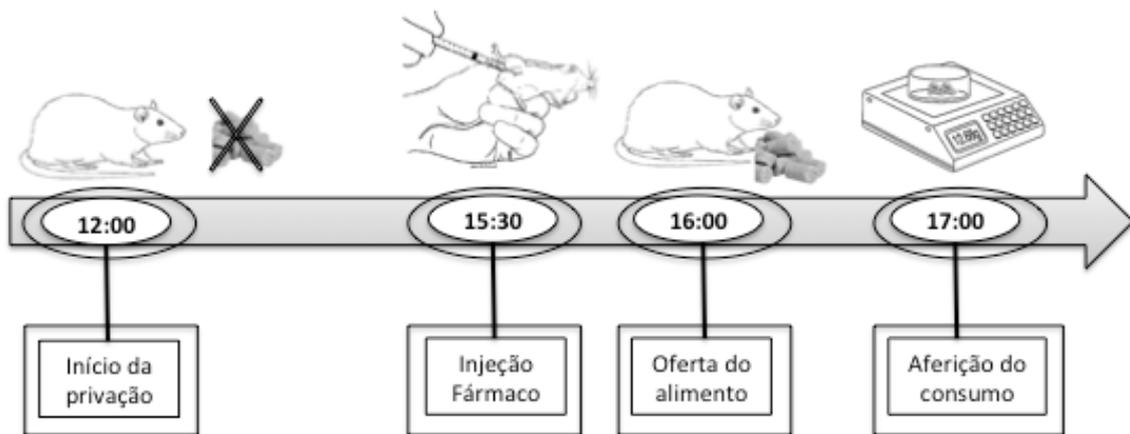


FIGURA 5. Esquema do teste de consumo alimentar em resposta à aplicação aguda de salina ou fenfluramina.

5.8 PCR em tempo real

Entre 40 e 50 dias de idade, os animais foram eutanasiados por decaptação dentro da faixa de horário de 16h às 17h e o hipotálamo e tronco encefálico foram seccionados e armazenados a -20°C. O RNA total das amostras foi obtido pelo método de extração com isotiocionato de guanidina usando o reagente TRIzol. Inicialmente os tecidos foram lisados utilizando o TRIzol. Depois de 5min de incubação, à temperatura ambiente, foi acrescentado clorofórmio nas amostras e em seguida centrifugadas a 1200RPM por 15min. A fase aquosa obtida foi transferida para outro tubo, adicionada

de isopropanol gelado sendo incubada por 10min e em seguida centrifugada a 12000RPM por 10min. O RNA formado foi então lavado com etanol a75% e centrifugado a 7000RPM por 5min. O sedimento de RNA (pellet) foi então ressuspenso em água livre de RNase e armazenado. A quantificação de RNA foi realizada em duplicata diluindo as amostras em proporção de 1:50 em água livre de RNase. A absorbância da amostra foi determinada por espectofotometria nos comprimentos de onda 260nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a análise de pureza do RNA, o valor da absorbância obtido a 260nm foi dividido pelo obtido a 280nm e as amostras que apresentaram razão de 260/280 igual ou superior a 1,8 foram utilizadas (indicativo de elevado grau de pureza).

O PCR em tempo real foi realizado com kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System, número de referência A6020 (Promega, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, foram utilizadas concentrações de 700ng de RNA, 10µmol de primer e duas unidades de Taq polimerase, com volume final de reação de 15µl. As análises foram performadas em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, USA). As sequências dos *primers* utilizados estão apresentadas na tabela 1.

TABELA 1. Desenho e número de referência dos primers utilizados no estudo.

Primer	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Ref.*
5ht1b	AGAAGAAACTCATGGCCGCT	GGGGAGCCAGCACACAATAA	NM_012765.3
5ht2c	ATTTGTGCCCCGTCTGGATT	CGCGAATTGAACCGGCTATG	NM_012765.3
SERT	AGCATCTGGAAAGGCGGTCAA	ACACCCCTGTCTCCAAGAGT	NM_013034.4
NPY	AGAGATCCAGCCCTGAGACA	AACGACAACAAGGGAAATGG	NM_012614.2
POMC	CCTATCGGGTGGAGCACTTC	GCGTTCTTGATGATGGCGTT	NM_139326.2
β2M	TGACCGTGATCTTTCTGGTG	ACTTGAATTTGGGGAGTTTTCTG	NM_012512.2

*Número de referência no PUBMED.

Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de controle interno *housekeeping* (β2M). A quantificação relativa de cada gene alvo foi analisada utilizando um método CT comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado para a referência endógena (β2M): $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a

diferença entre o CT entre o gene de interesse e $\beta 2M$ e para $\Delta\Delta CT = \text{média } \Delta CT \text{ da amostra} - \text{média } \Delta CT \text{ da amostra controle}$ (utilizada como calibração).

5.9 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais com os animais foram de acordo com os “Princípios éticos na experimentação animal”, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de experimentação animal (CONCEA), obedecendo às normas de manuseio e cuidado com os animais. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, sob número de processo 23076.043927/2014-60.

5.10 Análises estatísticas

Foi utilizado ANOVA *two-way*, com pós-teste de *tukey* ou *bonferroni* para comparação entre mais de dois grupos com mais de uma variável e ANOVA *one-way* para mais de dois grupos com apenas uma variável. O nível de significância foi aceito quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Peso corporal

Não foram observadas diferenças de peso corporal entre os animais dos diferentes grupos experimentais nas idades 15, 21 e 30 dias de vida. Porém, aos 35 dias de vida, o grupo desmame fêmea (DF) apresentou maior peso corporal em relação ao grupo controle fêmea (CF) (CF=108,7g \pm 4,3, n=10; DF= 116,9g \pm 7,7, n=12, p<0,05). Nos grupos controle e desmame, as fêmeas apresentaram menor peso aos 35 dias de vida quando comparadas aos machos (CM= 124,1g \pm 9,2, n=11; CF= 108,7g \pm 4,3, n=10, p<0,001; DM= 126,47g \pm 7,0, n=9; DF= 116,9g \pm 7,7, n=12, p<0,005). Aos 40 dias de vida, o grupo desmame, macho e fêmeas, apresentou maior peso corporal quando comparados ao grupo controle dos respectivos sexos (CM= 151,3g \pm 10,9, n=11; DM= 161,6 \pm 13,2, n=9, p<0,005; CF= 128,0g \pm 5,2, n=10; DF= 138,7g \pm 10,3, n=12, p<0,005). Nos grupos C e D, aos 40 dias de vida, houve redução do peso das fêmeas comparado aos machos (CM= 151,3g \pm 10,9, n=11; CF= 128,0g \pm , n=10, p<0,001; DM= 161,58g \pm 13,20, n=9; DF, 138,7g \pm 10,3, n=12, p<0,001) (Figura 6A).

Quanto ao percentual de ganho de peso, o grupo desmame precoce apresentou menor ganho de peso dos 15 aos 21 dias de idade em machos e fêmeas (CM= 43,8% \pm 9, n=12; DM= 26,8% \pm 9,3, n=7, p<0,05, Figura 6B; CF= 47,0 % \pm 6,5, n=4; DF= 30,8 % \pm 11,11, n=13, p<0,05, Figura 6C). Esta análise quando realizada entre os dias 21 e 30 revelou maior ganho de peso do grupo desmame comparado ao grupo controle em machos e fêmeas (CM= 85,7% \pm 8,8, n=11; DM= 118,3% \pm 9,4, n=5, p<0,05, Figura 6B; CF= 164,7% \pm 29,4, n=10; DF= 171,4% \pm 19,7, n=9, p<0,05, Figura 6C). O percentual de ganho de peso não foi diferente entre os grupos no período de 15 aos 30 dias de idade (Figura 6B e C).

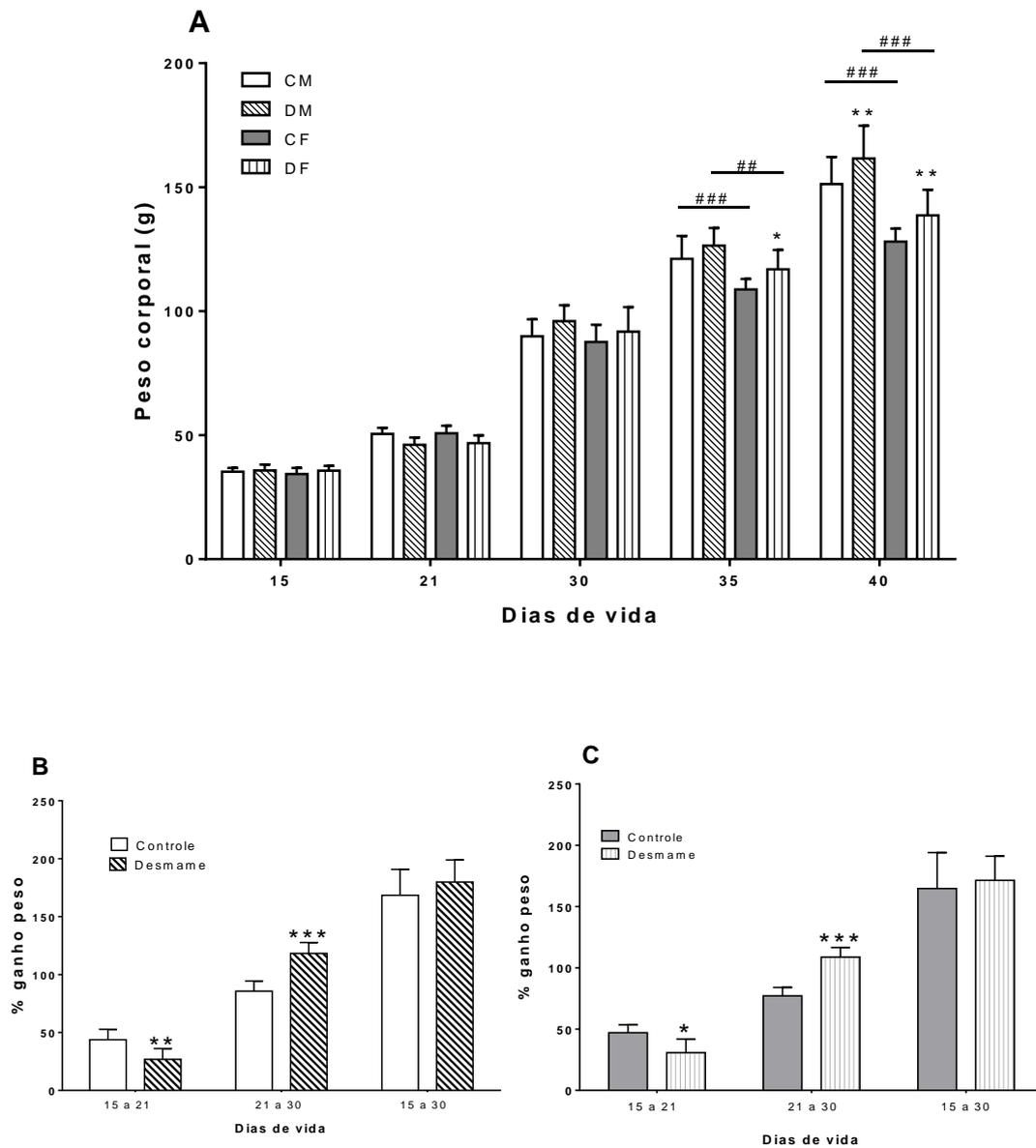


FIGURA 6. Efeito do desmame precoce sobre o peso corporal de ratos. Os animais foram desmamados aos 15 ou 30 dias de vida, constituindo os grupos desmame precoce ou controle, respectivamente. A, peso corporal em diferentes idades, B e C, percentual de ganho de peso corporal em diferentes faixas etárias em machos (B) e fêmeas (C). Os dados estão expressos em média \pm DP. (*) diferença intragrupo, (#) diferença intergrupo. *# $p < 0,05$, **### $p < 0,01$, ***### $p < 0,001$, ANOVA *two-way*, com pós-teste de *tukey*.

6.2 Ritmo de alimentação

No ritmo circadiano de alimentação, o grupo desmame macho (DM) apresentou maior consumo alimentar (g) comparado ao controle macho (CM) no intervalo entre 16h e 20h (CM= 0,8g \pm 0,8, n=10; DM= 2,5g \pm 1,0, n=9, $p < 0,005$). No intervalo entre 08h e 12h, o consumo alimentar do grupo desmame fêmea (DF) foi maior quando comparado ao grupo controle fêmea e aos grupos controle (CM) e desmame macho (DM) (CM= 2,9g \pm 0,9, n=10; DM, 2,9g \pm 1,1, n=9; CF, 3,0g \pm 1,2, n=9; DF, 4,5g \pm 1,2, n=9, $p < 0,005$). Por outro lado, no intervalo de 12h e 16h, o grupo CM apresentou maior consumo em relação aos demais grupos (CM= 6,6g \pm 2,1, n=10; DM= 5,0g \pm 1,4, n=9; CF=, 5,0g \pm 1,0, n=9; DF= 4,9g \pm 1,1, n=9, $p < 0,005$) (Figura 7A).

Quando avaliado o consumo alimentar total de 24 horas, houve menor consumo no grupo CF comparado ao CM (CM= 21,3g \pm 1,4, n=9; CF= 16,2g \pm 2,1, n=7). No entanto, o grupo DF consumiu mais comparado ao CF (CF= 16,2g \pm 2,1, n=7; DF, 20g \pm 1,8, n=9) (Figura 7B).

A análise do consumo alimentar durante as fases clara ou escura do ciclo de luminosidade, revelou menor consumo do grupo desmame comparado grupo controle em machos e maior em fêmeas no escuro (CM= 16,4g \pm 1,5, n=8; DM= 12,7g \pm 1,8, n=7; CF=12,2g \pm 1,8, n=7; DF= 14,5g \pm 1,4, n=9). Comparando macho e fêmeas, na fase escura, foi observado menor consumo de CF em relação ao grupo CM (CM= 16,4g \pm 1,5, n=8; CF= 12,2g \pm 1,8, n=7). Na fase clara, o grupo D apresentou maior consumo comparado ao grupo C apenas para os machos (CM= 5,0g \pm 0,9, n=8; DM= 7,1g \pm 1,2, n=8) (Figura 7C).

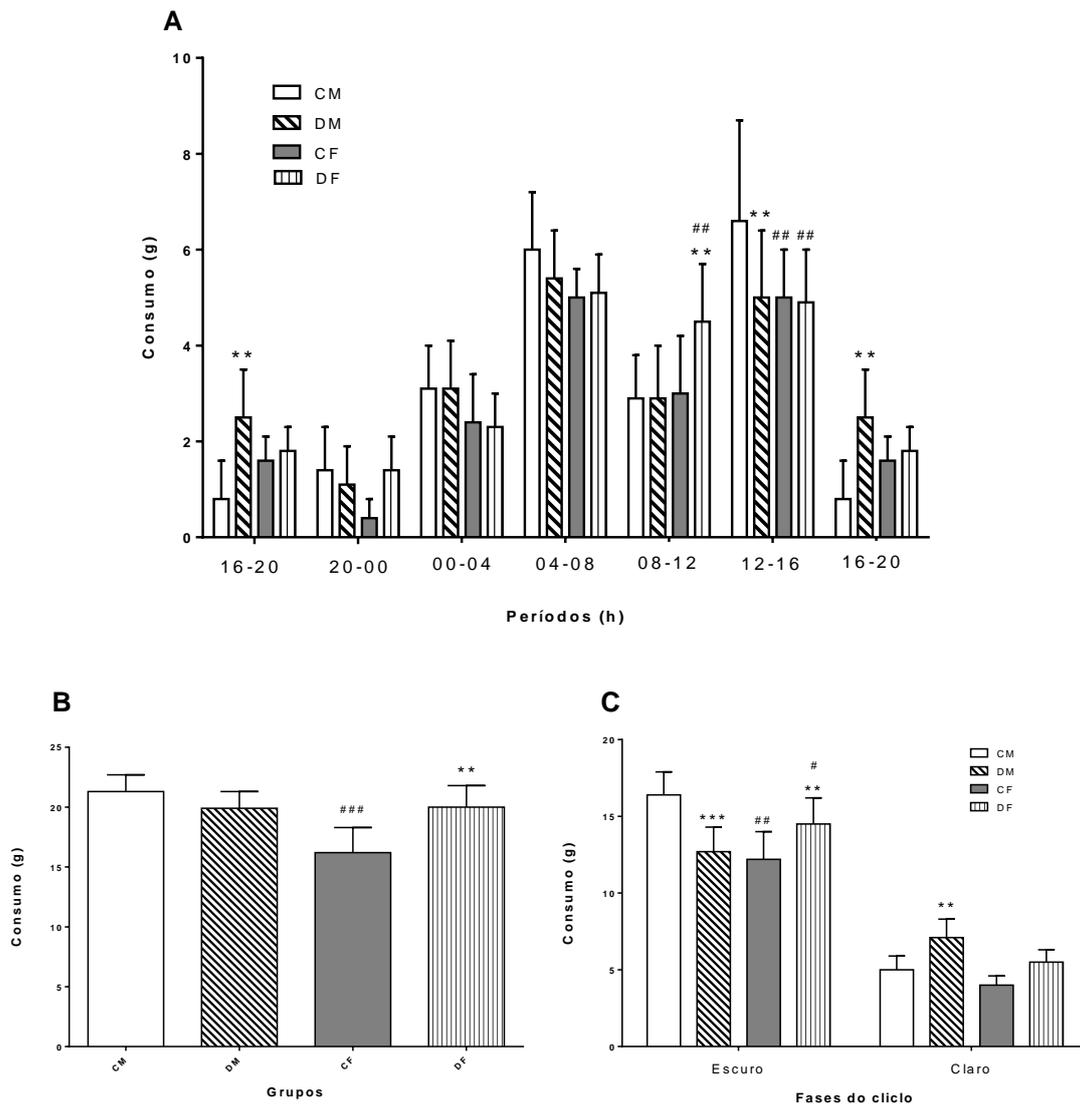


FIGURA 7. Efeito do desmame precoce sobre o ritmo circadiano de alimentação de ratos aos 34 dias de idade. Ratos foram desmamados aos 15 ou 30 dias de vida constituindo os grupos desmame precoce (D) ou controle (C), respectivamente. A, ritmo circadiano de alimentação mensurado a cada 4 horas. B, Consumo alimentar total em 24 horas. C, consumo alimentar por fases do ciclo circadiano, claro ou escuro. Os dados estão expressos em média \pm DP. (*) diferença intragrupo, (#) diferença intergrupo. * # $p < 0,05$, ** ## $p < 0,005$, *** ### $p < 0,001$, ANOVA *two-way* ou *one-way* com pós-teste de *tukey*.

6.3 Consumo alimentar em resposta à fenfluramina

Quando submetidos a tratamento agudo com fenfluramina, todos os grupos apresentaram redução do consumo alimentar comparados aos respectivos controles para a droga (CMS= 3,11g ± 1,03, n=11; CMF= 1,83g ± 0,63, n=11, p<0,05; DMS= 4,75 ± 0,57, n=8; DMF= 3,38 ± 0,6, n=8, p<0,05; CFS= 2,8g ± 0,6, n=8; CFF= 1,47g ± 0,8, n=7, p<0,005; DFS= 3,52g ± 0,8, n=9; DFF= 2,23g ± 0,47, n=10, p<0,05). Os animais machos D apresentaram maior consumo alimentar do que os machos C tanto em resposta à salina, quanto em resposta à fenfluramina (CMS= 3,11g ± 1,03, n=11; DMS=4,75 ± 0,57, n=8, p<0,05; CMF, 1,83g ± 0,63, n=11; DMF= 3,38 ± 0,6, n=8, p<0,05) (Figura 8A).

Avaliando o percentual de redução de consumo promovido pela droga, foi observado que não houve diferença entre os grupos de estudo (Figura 8B).

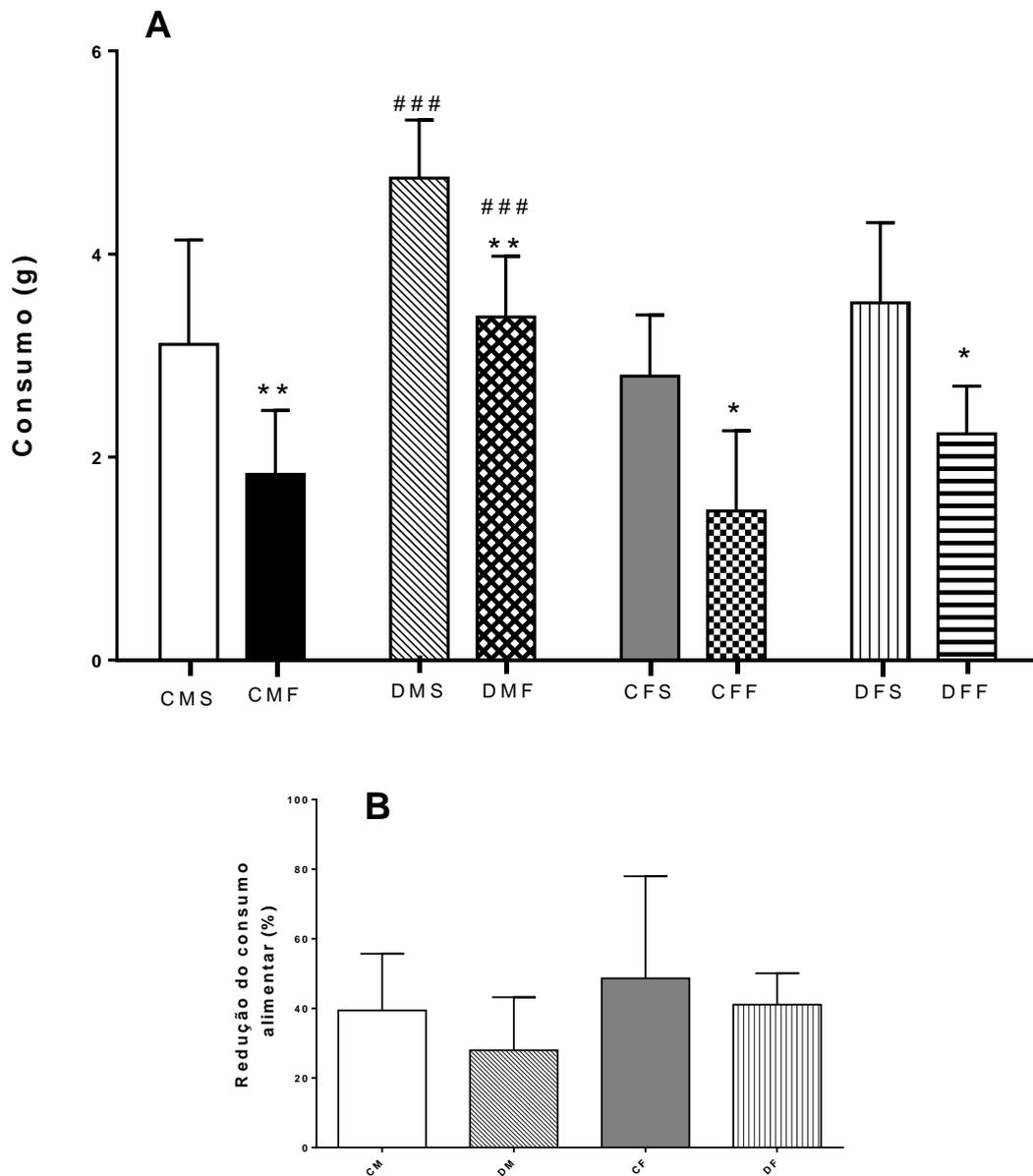


FIGURA 8. Efeito da fenfluramina sobre o consumo alimentar de ratos. Os animais foram desmamados aos 15 ou 30 dias de vida constituindo os grupos desmame precoce (DP) ou controle (C), respectivamente. A, consumo alimentar de 1 hora após injeção aguda de fenfluramina, B, efeito da fenfluramina aguda sobre o percentual de redução de consumo alimentar. Os dados estão expressos em média \pm DP. (*) diferença intragrupo, (#) diferença intergrupo. *# $p < 0,05$, ** ## $p < 0,005$, ANOVA two-way, com pós-teste de *tukey*.

6.4 Expressão gênica de peptídeos, transportador e receptores da 5-HT

O estudo da expressão gênica de peptídeos hipotalâmicos, do transportador e de receptores 5-HT relacionados ao controle do comportamento alimentar foi realizado no hipotálamo e no tronco encefálico de ratos dos grupos desmame (D) e controle (C), macho ou fêmeas. Nos resultados observamos que no hipotálamo, o grupo D apresentou maior expressão gênica de NPY, quando comparados ao grupo C, em machos, porém menor em fêmeas (CM= $1,0 \pm 0,14$, n=5; DM= $1,74 \pm 1,14$, n=4, $p < 0,05$; CF= $2,63 \pm 0,22$, n=4; DF= $0,50 \pm 0,21$, n=4, $p < 0,0001$, Figura 9A). Ainda no hipotálamo, o grupo D fêmeas, apresentou diminuição da expressão gênica de POMC (CF= $1,19 \pm 0,23$, n=4; DF= $0,21 \pm 0,21$, n=4, $p < 0,05$, Figura 9B), 5ht1b (CF= $1,45 \pm 0,19$, n=5; DF= $0,23 \pm 0,26$, n=4, $p < 0,001$, Figura 9C), 5ht2c (CF= $1,35 \pm 0,16$, n=5; DF= $0,54 \pm 0,31$, n=4, $p < 0,001$, Figura 9D) e SERT (CF= $1,09 \pm 0,20$, n=4; DF= $0,347 \pm 0,22$, n=4, $p < 0,05$, Figura 9E). Exceto para o peptídeo Y, o grupo D machos não apresentou diferenças em relação ao grupo controle.

Nas análises realizadas no tronco encefálico, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos C e D em machos. Por outro lado, o grupo D fêmeas, comparado do grupo C fêmeas apresentou aumento da expressão gênica do receptor 5ht1b (CF= $1,07 \pm 0,16$, n=5; DF= $2,18 \pm 0,06$, n=4, $p < 0,005$, Figura 10A) e do SERT (CF= $1,79 \pm 0,21$, n=5; DF= $4,57 \pm 0,23$, n=6, $p < 0,0001$, Figura 10C). Nenhuma diferença foi observada na expressão gênica do receptor 5ht2c no tronco encefálico (FIGURA 10 B).

Hipotálamo

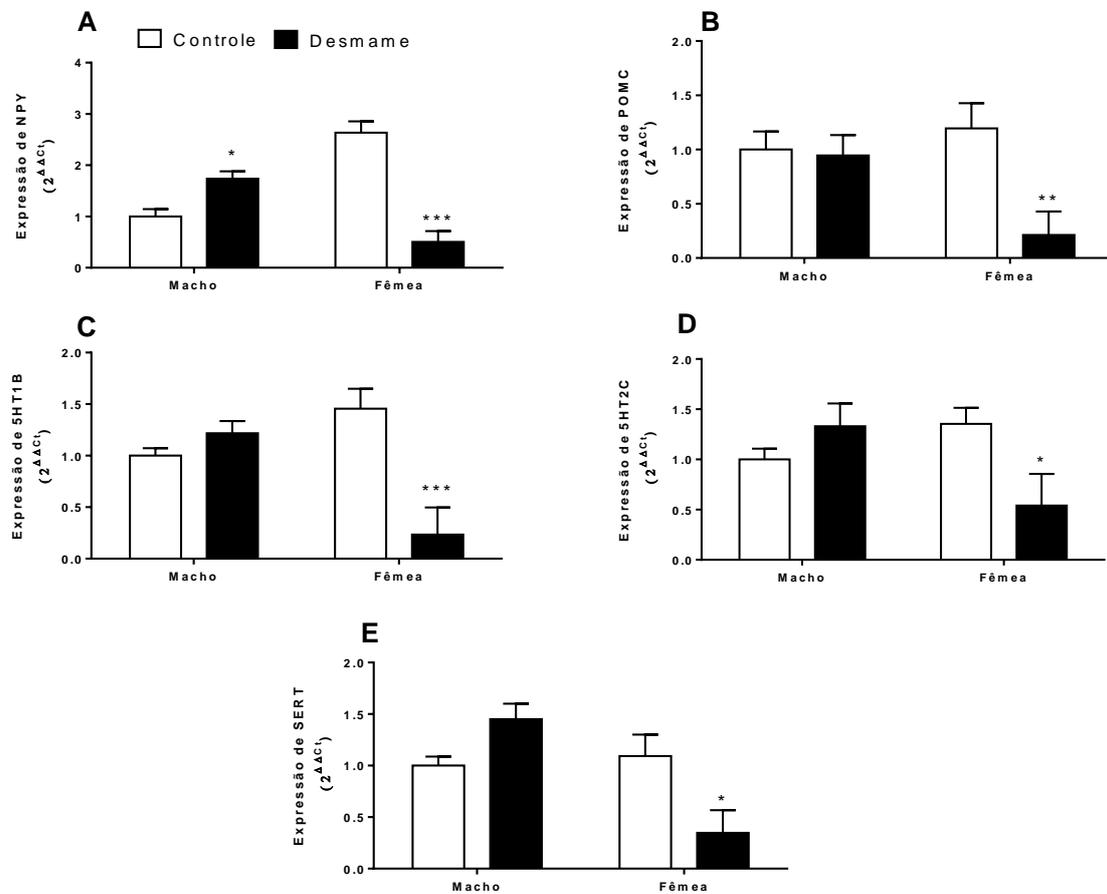


FIGURA 9. Efeito do desmame precoce sobre a expressão gênica de NPY, POMC, receptores e transportador da 5-HT no hipotálamo de animais com idade entre 40 e 50 dias de vida. Os animais foram desmamados aos 15 ou 30 dias de vida constituindo os grupos desmame precoce (D) ou controle (C), respectivamente. Expressão gênica de NPY (A), POMC (B), 5ht1b (C), 5ht2c (D) e SERT (E). Os dados estão expressos em média \pm DP. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ANOVA *two-way*, com pós-teste de *bonferroni*.

Tronco encefálico

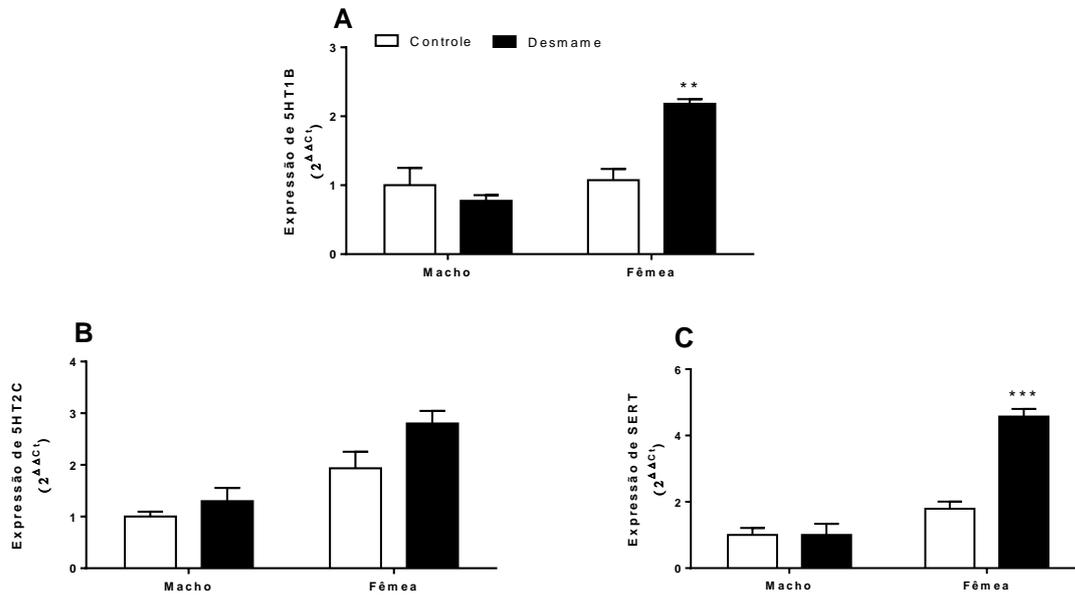


FIGURA 10. Efeito do desmame precoce sobre a expressão gênica de receptores e transportador da 5-HT no tronco encefálico de ratos com idade entre 40 e 50 dias. Os animais foram desmamados aos 15 ou 30 dias de vida constituindo os grupos desmame precoce (D) ou controle (C), respectivamente. Expressão gênica de 5ht1b (A), 5ht2c (B) e da SERT (C). Os dados estão expressos em média \pm DP. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, ANOVA *two-way*, com pós-teste de *bonferroni*.

7 DISCUSSÃO

O desmame precoce reduz o ganho de peso em ambos os sexos entre os dias 15 e 21 de idade, com posterior recuperação até os 30 dias. Ainda na adolescência, o desmame promoveu maior peso corporal em fêmeas e machos. O desmame prematuro também promoveu alterações de ritmo circadiano de alimentação, com redução de consumo na fase escura para machos e aumento na fase escura para fêmeas e clara para machos. O desmame não promove modificações na ação inibitória da fenfluramina sobre o consumo alimentar. Na análise molecular, o desmame precoce promoveu em machos elevada expressão de NPY no hipotálamo e, em fêmeas, redução da expressão de NPY, POMC, 5ht1b, 5ht2c e SERT no hipotálamo, e aumento de 5ht1b e SERT no tronco encefálico.

Na avaliação de evolução de peso corporal, foi observado que o desmame precoce promoveu redução de ganho de peso entre 15 e 21 dias, seguido de aumento de peso corporal na adolescência de fêmeas (35e 40 dias) ou machos (40 dias). No entanto, não foi observado efeito na análise do peso absoluto antes dos 30 dias de vida. Em estudo com método de desmame precoce igual ao do presente trabalho, foi observada redução de peso corporal entre os 16 e 18 dias de vida sem mais efeitos a partir desta idade (OLIVEIRA et al., 2011). A redução no ganho de peso, e não o peso absoluto, está de acordo com estes resultados (OLIVEIRA et al., 2011). Esta redução está relacionada a transição abrupta dos animais desmamados precocemente do leite materno para o alimento sólido, que tem composição nutricional diferente do leite materno (AZARA et al., 2008; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A energia fornecida pelo leite materno é principalmente originada dos lipídeos (69,8%), seguido das proteínas (23,4%) e dos carboidratos (6,8%) (AZARA et al., 2008). Por outro lado, a dieta padrão de biotério tem os carboidratos como principal fonte de calorias (64%), seguido de proteínas (19,3%) e lipídeos (16,7%) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Em roedores, a caseína do leite materno tem aumento progressivo de concentração até os 20 dias de lactação e a transferrina apresenta pico na concentração do 10° ao 20° dia de lactação (NICHOLAS; HARTMANN, 1991). Para o rato que é desmamado precocemente, há perda abrupta desta evolução na concentração de nutrientes no leite, o que provoca a redução de ganho de peso nos primeiros dias de desmame.

Após período inicial de redução de peso, o desmame precoce promoveu maior ganho de peso, indicando recuperação ponderal denominada *catch-up* de crescimento

(WI; BOERSMA, 2002). Essa aceleração do crescimento em decorrência de alguma privação perinatal ocorre em um curto período de tempo, o que está amplamente associado na literatura a modificações do metabolismo energético à longo prazo, aumento do risco de mortalidade e de desenvolvimento de doenças crônicas, tanto em modelos animais como em humanos (COUPÉ et al., 2012; SHAHKHALILI et al., 2010; SINGHAL, 2017). Esta recuperação do ganho de peso mascarou o percentual ganho de peso quando avaliado dos 15 aos 30 dias de vida, em que não se observa diferenças entre desmame precoce e desmame natural e pode ser a causa da elevação do peso corporal em fêmeas aos 35 e 40 dias de idade e machos aos 40 dias de idade.

O desmame precoce não alterou o padrão macroestrutural do ritmo circadiano de alimentação. Roedores consomem cerca de 75 a 80% de sua alimentação na fase escura do ciclo (TUREK et al., 2005), o que se manteve neste estudo. Porém, quando avaliado o consumo alimentar no ciclo de 24 horas, o desmame precoce promoveu aumento do consumo de fêmeas. A análise do consumo alimentar por fases do ciclo circadiano, revelou que o desmame precoce induziu maior consumo na fase escura para fêmeas, quando comparadas ao seu controle de sexo e maior na fase clara para machos em relação a seus controles de sexo. Além disso, houve um platô de consumo alimentar em fêmeas na fase escura, apresentando um ritmo constante de alimentação, quando todos os outros grupos possuem dois picos distintos de alimentação. Em mamíferos, o contato com a mãe é essencial para o estabelecimento do ritmo circadiano da prole (TAKAHASHI et al., 1984). Diversos estudos demonstraram que o cuidado materno é essencial para a formação de ritmo nos filhotes. Quando submetidos a enucleação do olho no início da vida pós-natal, estes filhotes tiveram o ritmo circadiano arrastado quando eram transferidos para mães adotivas (HONMA; HONMA; HIROSHIGE, 1987; SUGISHITA et al., 1993). Além de ritmos comportamentais, a expressão dos genes período1 e período2, envolvidos na regulação do ritmo circadiano, sofre influência do cuidado materno, especialmente na 1ª e 3ª semanas de vida dos filhotes (OHTA et al., 2002). Também, aos 15 dias de vida, os ratos têm iniciado a abertura dos olhos (LOPES DE SOUZA et al., 2004), por isso ainda estão começando a regular o seu ciclo circadiano pela presença ou ausência de luz. Durante essa fase, o ritmo de alimentação dos filhotes é determinado pelos comportamentos da mãe e pelo conteúdo do leite materno (KATZER et al., 2016;

LEVIN; STERN, 1975; NOZHENKO et al., 2015).

Além disso, a leptina, um dos principais hormônios periféricos responsáveis pela regulação do metabolismo energético, também é fornecido pelo leite materno para os neonatos (NOZHENKO et al., 2015). Aos 15 dias de lactação há ritmicidade correlacionada entre os níveis séricos de leptina materna e a leptina secretada no leite materno para os filhotes, justamente na idade em que os animais iniciam a abertura dos olhos e vão iniciar a formação de seu ciclo endógeno (NOZHENKO et al., 2015).

Estudos em humanos têm demonstrado que o leite materno contém substâncias que regulam o ciclo sono/vigília dos filhos, como a melatonina, que se apresenta em diferentes concentrações no leite materno a depender da fase do ciclo (KATZER et al., 2016). Em outro estudo, também em humanos, foi demonstrado que as variações circadianas de concentração de triptofano no leite materno possuem relação com o metabólito da melatonina excretado na urina dos filhos, e que isso é determinante para a regulação do ciclo sono-vigília das crianças (CUBERO et al., 2005). Assim, no presente estudo, a interrupção precoce do cuidado e do aleitamento materno possivelmente alterou os ritmos circadianos dos filhotes, induzindo o desenvolvimento de um relógio biológico sem as influências exógenas provenientes de sua mãe, alterando a ritmicidade até a idade da adolescência.

Quando submetidos a teste de ingestão alimentar em resposta à fenfluramina, todos os grupos apresentaram redução de consumo alimentar. Este resultado demonstrou que, em nível comportamental, o sistema serotoninérgico não sofre alterações decorrentes do desmame precoce. A utilização de drogas para testar a ação de sistemas de neurotransmissão a nível comportamental é um método relativamente simples e bastante utilizado (BAE et al., 2013; DA SILVA et al., 2017; FERRO CAVALCANTE et al., 2016; LOPES DE SOUZA et al., 2008a). No que diz respeito à fenfluramina, esta é uma droga que comprovadamente atua inibindo a ingestão alimentar sem alterar a estrutura da alimentação, como demonstrado em testes de sequência comportamental de saciedade, método utilizado para avaliar o efeito de fármacos sobre a alimentação (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998).

Em animais desnutridos, já é sabido, por exemplo, que o sistema serotoninérgico é hipofuncionante através dos receptores 5ht1b que não respondem

a agonista específico no que diz respeito à ingestão alimentar (LOPES DE SOUZA et al., 2008a). Em animais desmamados precocemente, a nível comportamental, já foram observados retardo no ponto de saciedade em machos (OLIVEIRA et al., 2011), o que nos levou à hipótese de que o sistema serotoninérgico de animais desmamados precocemente também poderia estar hipofuncionante. Porém, com a utilização de droga serotoninérgica, a fenfluramina, os animais desmamados precocemente de ambos os sexos apresentaram redução do consumo alimentar, demonstrando funcionalidade do sistema serotoninérgico e que não é este sistema que está por trás de alterações de saciedade apresentadas por ratos desmamados antes do período natural.

No presente estudo, o desmame precoce promoveu aumento da expressão gênica de NPY no hipotálamo em machos, e redução da expressão gênica de NPY, POMC, 5ht1b, 5ht2c e SERT no hipotálamo, e aumento da expressão de 5ht1b e SERT no tronco encefálico em fêmeas. Uma das limitações deste estudo foi não ter avaliado a fase estral das fêmeas nem parâmetros hormonais, visto que entre os sexos as variações hormonais são presentes, ainda mais na idade da adolescência, por isso, apenas sugerimos que as diferenças sejam decorrentes de diferenças hormonais.

Componentes do controle do comportamento alimentar apresentam dimorfismo sexual, como o sistema de orexinas que apresenta flutuações circadianas de acordo com o ciclo estral de ratas, o que não é observado em machos, além deste mesmo sistema ser mais ativado em fêmeas por causa dos estrogênios (CATALDI; LUX-LANTOS; LIBERTUN, 2018). Além disso, os hormônios gonadais modulam as características corporais e comportamentais de animais de acordo com o sexo. Por exemplo, machos são caracteristicamente maiores e consomem mais alimentos do que fêmeas, devido aos seus hormônios gonadais, e quando ambos os sexos são gonadectomizados, eles se igualam nas características corporais e de consumo alimentar (CZAJA, 1984).

Poucos estudos avaliaram, em nível celular ou molecular, o comportamento alimentar de ratos desmamados precocemente. Semelhante aos achados do presente estudo, uma pesquisa observou aumento de expressão protéica de NPY no hipotálamo de ratos machos desmamados precocemente por método de bandagem nas tetas das fêmeas, aos 21 dias de idade, bem como aumento de imunorreatividade

ao NPY nos núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo na idade adulta (YOUNES-RAPOZO et al., 2012). No presente estudo, o horário de coleta do hipotálamo para estudo da expressão gênica, coincide com o final do ciclo escuro, assim, podemos sugerir que o maior consumo na fase clara de ratos machos desmamados precocemente está relacionado ao maior nível de NPY observado. Somando a elevação na expressão de NPY à inversão das fases de alimentação, justifica-se também o elevado peso corporal em machos aos 40 dias de vida, já que é bastante demonstrado na literatura que inversão de ciclo de alimentação promove ganho de peso e alterações metabólicas (GLAD et al., 2011).

No nosso conhecimento, ainda não existe estudo avaliando os efeitos do desmame precoce sobre o controle do comportamento alimentar em fêmeas. Neste estudo, os componentes do sistema serotoninérgicos avaliados, receptores 5ht1b e 2C e SERT, estão diminuídos no hipotálamo, porém 5ht1b e SERT estão aumentados no tronco encefálico em fêmeas. No tronco encefálico estão localizados a maioria dos neurônios serotoninérgicos do SNC, especificamente nos núcleos da rafe (BAE et al., 2013). O aumento da expressão de 5ht1b e SERT no tronco encefálico pode ser reflexo de inibição de produção e liberação de serotonina, visto que o receptor 5ht1b localiza-se nas extremidades axonais dos neurônios serotoninérgicos e tem função inibitória, assim como o SERT (VOIGT; FINK, 2015). Assim, podemos sugerir que a quantidade de serotonina produzida e liberada nesses animais esteja reduzida. Essa ação inibitória sobre os neurônios serotoninérgicos de uma forma sexo-dependente talvez seja devida as variações hormonais de acordo com o sexo.

Respostas mais exacerbadas ao estresse ocorrem em fêmeas. Estudo em roedores demonstrou aumento de níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), corticosterona e do hormônio liberador de corticotropina (CRH) no PVN apenas em fêmeas (GRUNDWALD; BRUNTON, 2015). Além disso, fêmeas apresentam maior resposta de proteína ligante de RNA mensageiro de CRH na pituitária em resposta ao estresse (STINNETT; WESTPHAL; SEASHOLTZ, 2015). Portanto, especulamos que naturalmente as fêmeas possuem elevados níveis de CRH, o que sugerimos ser ainda mais aumentado em decorrência do evento de estresse neonatal pelo desmame precoce.

O CRH exerce ação inibitória sobre os neurônios serotoninérgicos nos núcleos na rafe, seja por via direta ou por intermédio de neurônios GABAérgicos (KIRBY et al.,

2008). Sua relação íntima com o sistema serotoninérgico se dá através de projeções axonais dos neurônios CRH no PVN para os núcleos da rafe, além de os terminais axonais destes neurônios estarem localizados próximo ao corpo celular e dendritos primários dos neurônios serotoninérgicos na rafe (AUSTIN; RHODES; LEWIS, 1997; RUGGIERO et al., 1999). A própria ontogênese do sistema de CRH é diferenciada de acordo com o sexo, pois em estudo que buscou avaliar a ontogênese dos receptores de CRH, em função do sexo, em áreas chave de produção de monoaminas no tronco encefálico, foi demonstrado que fêmeas apresentam níveis elevados de receptores CRH1 na rafe dorsal e ventrolateral, e CRH2 na rafe dorsal (LUKES et al., 2016). Em outro estudo que observou a ação do CRH na liberação de 5HT na rafe, foi observado que o CRH inibiu a estimulação elétrica dos neurônios serotoninérgicos (NAZZARO et al., 2009). Assim, especulamos que, nas fêmeas desmamadas precocemente, há um elevado nível de produção de CRH, que consequentemente pode estar inibindo os neurônios serotoninérgicos no tronco encefálico.

Quando o hipotálamo de ratas desmamadas precocemente foi avaliado, a expressão gênica do receptor 5ht1b e do SERT foi reduzida, contrário do observado no tronco encefálico. Como no tronco provavelmente está havendo inibição dos neurônios serotoninérgicos, os níveis deste neurotransmissor podem estar baixos no encéfalo. Baixa sinalização de serotonina está associada a hiperfagia (LOPES DE SOUZA et al., 2008b). A compensação da redução de serotonina encefálica, pode ser redução da expressão de 5ht1b e SERT no hipotálamo. Isto provavelmente para que os terminais serotoninérgicos ali presentes não fossem inibidos e para que se diminuísse a recaptção da serotonina. Esse mecanismo compensatório observado no hipotálamo pode explicar a diminuição da expressão gênica do NPY observada nas fêmeas. No corpo celular dos neurônios que produzem este neuropeptídeo, também há expressão de receptores serotoninérgicos 5ht1b, que quando estimulados positivamente promovem a inibição dos neurônios NPY (GARFIELD; HEISLER, 2009). Com a redução da inibição da liberação de serotonina nos neurônios serotoninérgicos hipotalâmicos como mecanismo compensatório, o sistema de inibição de NPY pôde ocorrer. Porém, como a análise de expressão gênica foi avaliada no hipotálamo como um todo não podemos afirmar a localização específica de onde houve inibição ou preservação dos níveis de receptores 5ht1b, apenas sugerimos que ocorreu da forma citada acima.

Também no hipotálamo de fêmeas foram observadas redução na expressão gênica de POMC e 5ht2c promovidas pelo desmame precoce. Diferentemente dos receptores 5ht1b, os 5ht2c exercem função excitatória nos neurônios em que é expresso (GARFIELD; HEISLER, 2009). Os receptores 2C são expresso nos corpos neuronais dos neurônios POMC no ARQ, promovendo sua ativação (GARFIELD; HEISLER, 2009). A desnutrição na vida precoce, promove redução na expressão de receptores 5ht2c, o que demonstra sua vulnerabilidade a agressões perinatais (MARTIN-GRONERT et al., 2016). Neste estudo, a diminuição da expressão de 5ht2c pode estar relacionado a diminuição da expressão de POMC, pois seu estímulo positivo ativa os neurônios POMC (GARFIELD; HEISLER, 2009).

O desmame precoce parece induzir adaptações na expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico e peptídeos de controle do comportamento alimentar no hipotálamo. Estas modificações foram dependentes do sexo dos animais. Assim, em ratos machos desmamados precocemente observou-se apenas aumento do NPY hipotalâmico, por outro lado, redução de componentes serotoninérgicos e peptídeos foram promovidos pelo desmame precoce em fêmeas. Associando aos resultados comportamentais obtidos, a hiperfagia e inversão do ciclo de alimentação podem ser devidas ao aumento da expressão de NPY no final da fase escura em ratos machos. Por outro lado, a hiperfagia promovida pelo desmame precoce em fêmeas pode ser decorrente de diminuição na produção e liberação da serotonina e redução na sinalização anorexígena de POMC.

8 CONCLUSÃO

A ação do sistema serotoninérgico sobre o consumo alimentar não é alterada pelo desmame precoce, em nível comportamental. No entanto, em nível molecular, houveram modificações no sistema serotoninérgico de forma sexo-dependente. Enquanto machos não apresentaram nenhuma alteração molecular no sistema serotoninérgico, fêmeas apresentam modificações na expressão de componentes chave deste sistema no hipotálamo e tronco encefálico, como os receptores 5ht1b, 5ht2c, e o transportador de serotonina (SERT), com consequente modificação na expressão de peptídeos do comportamento alimentar.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, M. M. I. Central and peripheral control of food intake. **Endocrine Regulations**, v. 51, n. 1, 2017.

AHOLA, M. K.; VAPALAHTI, K. Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2017.

ALTMAN, J.; DAS, G. D.; SUDARSHAN, K. The Influence of Nutrition on Neural and Behavioral Development. I. Critical Review of Some Data on the Growth of the Body and the Brain Following Dietary Deprivation During Gestation and Lactation. **Developmental psychobiology**, v. 3, n. 4, p. 281–301, 1970.

ALVES, A. et al. International Journal of Developmental Neuroscience Perinatal undernutrition stimulates seeking food reward. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 334–341, 2013.

ALVES, A. et al. International Journal of Developmental Neuroscience Low protein diet during gestation and lactation increases food reward seeking but does not modify sucrose taste reactivity in adult female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 49, p. 50–59, 2016.

ALVES, M. B. et al. Increased palatable food intake and response to food cues in intrauterine growth-restricted rats are related to tyrosine hydroxylase content in the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. **Behavioural Brain Research**, v. 287, p. 73–81, 2015.

AUSTIN, M. C.; RHODES, J. L.; LEWIS, D. A. Differential distribution of corticotropin-releasing hormone immunoreactive axons in monoaminergic nuclei of the human brainstem. **Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 5, p. 326–341, 1997.

AZARA, C. R. P. et al. Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups. **Biological research**, v. 41, p. 317–330, 2008.

BAE, S. et al. Adolescence fluoxetine increases serotonergic activity in the raphe-hippocampus axis and improves depression-like behaviors in female rats that experienced neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 6, p. 777–788, 2013.

- BANQUERI, M.; MENDEZ, M.; ARIAS, J. L. Behavioral effects in adolescence and early adulthood in two length models of Maternal Separation in male rats. **Behavioural Brain Research**, 2017.
- BARAHONA, M. J. et al. Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. **Glia**, n. October, p. 1–14, 2017.
- 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. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 513, mar. 2007.
- BERTHOUD, H.-R. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 478–487, 2012.
- BERTHOUD, H.; MÜNZZBERG, H.; MORRISON, C. D. Blaming the brain for obesity: Integration of hedonic and homeostatic mechanisms. **Gastroenterology**, 2017.
- BLUNDELL, J. E. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. **Appetite**, v. 7, p. 39–56, 1986.
- BOURET, S. G. Development of Hypothalamic Circuits That Control Food Intake and Energy Balance. **Appetite and Food Intake: Central Control**, 2017.
- CAMACHO, A. et al. Obesogenic diet intake during pregnancy programs aberrant synaptic plasticity and addiction-like behavior to a palatable food in offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 330, n. May, p. 46–55, 2017.
- CARRUBA, M. O. et al. Peripheral and central mechanisms of action of serotonergic anorectic drugs. **Appetite**, v. 7, p. 105–113, 1986.
- CATALDI, N. I.; LUX-LANTOS, V. A.; LIBERTUN, C. Perinatal programming of the orexinergic (hypocretinergic) system in hypothalamus and anterior pituitary by testosterone. **Peptides**, v. 99, p. 117–127, 2018.
- COUPÉ, B. et al. Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- CUBERO, J. et al. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. **Neuroendocrinology Letters**, v. 26, n. 6, p. 657–661, 2005.

CZAJA, J. A. Sex differences in the activational effects of gonadal hormones on food intake and body weight. **Physiology & behavior**, v. 33, n. 4, p. 553–558, 1984.

D'AGOSTINO, G. et al. Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. **eLife**, v. 5, n. MARCH2016, 2016.

DA SILVA, A. A. M. et al. Undernutrition during pregnancy and lactation increases the number of fos-cells in the reward system in response to a 5-HT6 receptor agonist in male adolescent rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 1–6, 2017.

DE SOUZA, J. A. et al. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. **Appetite**, v. 123, p. 114–119, 2018.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: **Brain, Behavior, and Iron in the Infant Diet**. [s.l: s.n.]. p. 1–17.

DOBBING, J.; HOPEWELL, J. W.; LYNCH, A. Vulnerability of developing brain: VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. **Experimental Neurology**, v. 32, n. 3, p. 439–447, 1971.

DOBBING, J.; SANDS, J. Vulnerability of Developing Brain IX. The Effect of Nutritional Growth Retardation on the Timing of the Brain Growth-Spurt. **Biology of the Neonate**, v. 378, p. 363–378, 1971.

DOS SANTOS OLIVEIRA, L. et al. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 1, p. 75–80, 2011.

EE, J. H. L. et al. Early life stress experience may blunt hypothalamic leptin signalling. **Journal of Biosciences**, 2013.

FERRO CAVALCANTE, T. C. et al. Effects of perinatal protein malnutrition and fenfluramine action on food intake and neuronal activation in the hypothalamus and raphe nuclei of neonate rats. **Physiology and Behavior**, v. 165, p. 35–42, 2016.

FRANSEN, H. P. et al. Exposure to Famine at a Young Age and Unhealthy Lifestyle Behavior Later in Life. v. 10, p. 1–11, 2016.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. **Leptin and the regulation of body weight in mammals***Nature*, 1998.

FRIZZO, M. E. **Can a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Act as a Glutamatergic Modulator?***Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental*, 2017.

GARFIELD, A. S.; HEISLER, L. K. **Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity**. *Journal of Physiology. Anais...*2009

GIBBS, B. G.; FORSTE, R. Socioeconomic status, infant feeding practices and early childhood obesity. ***Pediatric Obesity***, p. 135–146, 2013.

GLAD, C. A. M. et al. Reverse feeding suppresses the activity of the GH Axis in rats and induces a preobesogenic state. ***Endocrinology***, v. 152, n. 3, p. 869–882, 2011.

GRACIA-RUBIO, I. et al. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. ***Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry***, v. 65, p. 104–117, 2016.

GRUNDWALD, N. J.; BRUNTON, P. J. Prenatal stress programs neuroendocrine stress responses and affective behaviors in second generation rats in a sex-dependent manner. ***Psychoneuroendocrinology***, v. 62, p. 204–216, 2015.

HALFORD, J. C. G.; WANNINAYAKE, S. C. D.; BLUNDELL, J. E. **Behavioral Satiety Sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake***Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1998.

HONMA, S.; HONMA, K.; HIROSHIGE, T. Restricted daily feeding during nursing period resets circadian locomotor rhythm of infant rats. ***Am J Physiol***, v. 252, n. 2 Pt 2, p. R262-8, 1987.

HUME, C.; JACHS, B.; MENZIES, J. Homeostatic Responses to Palatable Food Consumption in Satiated Rats. v. 24, n. 10, p. 2126–2132, 2016.

ISHIWATA, T.; HASEGAWA, H.; GREENWOOD, B. N. Involvement of serotonin in the ventral tegmental area in thermoregulation of freely moving rats. ***Neuroscience Letters***, v. 653, p. 71–77, 2017.

JUAN DE SOLIS, A. et al. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation

- of hypothalamic feeding circuits. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 3, p. 198–209, 2016.
- KANARI, K. et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 45–52, 2005.
- KATZER, D. et al. Melatonin Concentrations and Antioxidative Capacity of Human Breast Milk According to Gestational Age and the Time of Day. **Journal of Human Lactation**, v. 32, n. 4, p. NP105-NP110, 2016.
- KIKUSUI, T.; MORI, Y. **Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents**. *Journal of Neuroendocrinology*. **Anais...**2009
- KIRBY, L. G. et al. Corticotropin-releasing factor increases GABA synaptic activity and induces inward current in 5-hydroxytryptamine dorsal raphe neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 48, p. 12927–37, 2008.
- LAHTI, M. et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: the influence of maternal stress in pregnancy. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2017.
- LEE, M. D.; CLIFTON, P. G. Partial reversal of fluoxetine anorexia by the 5-HT antagonist metergoline. **Psychopharmacology**, 1992.
- LEVIN, R.; STERN, J. M. Maternal Influences on Ontogeny of Suckling and Feeding Rhythms in the Rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 88, n. 7, p. 711–721, 1975.
- LIRA, L. A. et al. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, ago. 2014.
- LOPES DE SOUZA, S. et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiology and Behavior**, v. 82, n. 2–3, p. 375–379, 2004.
- LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400–1408, 2008a.

- LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **The European journal of neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400–8, mar. 2008b.
- LUKKES, J. L. et al. Sex differences in the ontogeny of CRF receptors during adolescent development in the dorsal raphe nucleus and ventral tegmental area. **Synapse**, v. 70, n. 3, p. 125–132, 2016.
- MARTIN-GRONERT, M. S. et al. 5-HT_{2A} and 5HT_{2c} receptors as hypothalamic targets of developmental programming in male rats. **Disease models & mechanisms**, v. 9, n. 4, p. 401–12, 2016.
- MASSARO, T. F.; LEVITSKY, D. A.; BARNES, R. H. Protein malnutrition induced during gestation: Its effect on pup development and maternal behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 10, n. 4, p. 339–345, 1977.
- MICHAELS, C. C.; HOLTZMAN, S. G. Neonatal stress and litter composition alter sucrose intake in both rat dam and offspring. v. 89, p. 735–741, 2006.
- MOGI, K. et al. Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. **Developmental Psychobiology**, v. 58, n. 8, p. 1034–1042, 2016.
- MONTAGUE, C. T. et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 903–908, 1997.
- MORGANE, P. J. et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, n. 3, p. 137–230, 1978.
- MORGANE, P. J. et al. Power spectral analysis of hippocampal and cortical EEG activity following severe prenatal protein malnutrition in the rat. **Developmental Brain Research**, v. 22, n. 2, p. 211–218, 1985.
- MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.
- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 26, n. 4, p. 471–83, jun. 2002.

- MOUSSAOUI, N. et al. Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, and fecal microbiota at weaning: Influence of sex. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 23, n. 1, p. 135–143, 2017.
- NAKAMURA, K. et al. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5ht1b mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 2, p. 442–448, 2008.
- NAZZARO, C. et al. Inhibition of serotonin outflow by nociceptin/orphaninFQ in dorsal raphe nucleus slices from normal and stressed rats: Role of corticotropin releasing factor. **Neurochemistry International**, v. 54, n. 5–6, p. 378–384, 2009.
- NICHOLAS, K. R.; HARTMANN, P. E. Milk secretion in the rat: Progressive changes in milk composition during lactation and weaning and the effect of diet. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 98, n. 3–4, p. 535–542, 1991.
- NOVÁKOVÁ, V. et al. Effect Of Early And Late Weaning on Learning in Adult Rats. **Nature**, v. 193, p. 280, 1962.
- NOZHENKO, Y. et al. Milk leptin surge and biological rhythms of leptin and other regulatory proteins in breastmilk. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 2015.
- OHTA, H. et al. Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 1953–1960, 2002.
- OLIVEIRA, S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 1, p. 119–124, 2011.
- OROZCO-SÓLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 3, p. 481–92, mar. 2009.
- PALACIOS, J. M. Serotonin receptors in brain revisited. **Brain Research**, v. 1645, p. 46–49, 2015.
- REEVES; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n.

11, p. 1939–1951, 1993.

REYNAERT, M. et al. Hedonic sensitivity to natural rewards is affected by prenatal stress in a sex-dependent manner. 2015.

ROCHA, M. L. M. et al. Undernutrition during early life alters neuropeptide Y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. **Neuroscience**, v. 256, p. 379–391, 2014.

ROOIJ, S. R. DE et al. Prenatal undernutrition and leukocyte telomere length in late adulthood : the Dutch famine birth cohort study 1. n. 1, p. 655–660, 2015.

RUGGIERO, D. A. et al. Corticotropin-releasing hormone and serotonin interact in the human brainstem: Behavioral implications. **Neuroscience**, v. 91, n. 4, p. 1343–1354, 1999.

RYU, V. et al. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. p. 1355–1362, 2008.

SCHWARTZ, G. J.; ZELTSER, L. M. Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. **Annual review of nutrition**, v. 33, p. 1–21, jan. 2013.

SHAHKHALILI, Y. et al. Comparison of two models of intrauterine growth restriction for early catch-up growth and later development of glucose intolerance and obesity in rats. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 1, p. R141–R146, 2010.

SHIMOZURU, M. et al. Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of wistar rats. **Developmental Psychobiology**, v. 49, n. 4, p. 343–350, 2007.

SILVA, M. C. et al. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. v. 5, p. 219–228, 2014.

SIMON, J. J. et al. Integration of homeostatic signaling and food reward processing in the human brain. p. 1–17, 2017.

SINGHAL, A. Long-Term Adverse Effects of Early Growth Acceleration or Catch-Up Growth. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, n. 3, p. 236–240, 2017.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 28, n. 1, p. 85–95, 1971.

SOUSA-FERREIRA, L.; ALMEIDA, L. P. DE; CAVADAS, C. **Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation***Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2014.

SPENCER, W. C.; DENERIS, E. S. Regulatory Mechanisms Controlling Maturation of Serotonin Neuron Identity and Function. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 2017.

STINNETT, G. S.; WESTPHAL, N. J.; SEASHOLTZ, A. F. Pituitary CRH-binding protein and stress in female mice. **Physiology and Behavior**, v. 150, p. 16–23, 2015.

STOJAKOVIC, A. et al. Effects of nicotine on homeostatic and hedonic components of food intake. 2017.

SUGISHITA, M. et al. Periodic mother deprivation during the light period reversed the phase of serotonin N-acetyltransferase activity rhythm of the pineal gland in rat pups. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 46, n. 3, p. 609–615, 1993.

TAKAHASHI, K. et al. Further evidence that circadian rhythm of blinded rat pups is entrained by the nursing dam. **The American journal of physiology**, v. 246, n. 3 Pt 2, p. R359-63, 1984.

TUOMINEN, L. et al. NeuroImage Aberrant mesolimbic dopamine – opiate interaction in obesity. **NeuroImage**, v. 122, p. 80–86, 2015.

TUREK, F. W. et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1043–5, 2005.

VOIGT, J. P.; FINK, H. **Serotonin controlling feeding and satiety***Behavioural Brain Research*, 2015.

WI, J.-M.; BOERSMA, B. Catch-up growth: definition, mechanisms, and models. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 15 Suppl 5, p. 1229–1241, 2002.

YI-HAO YU. Making sense of metabolic obesity and hedonic obesity. **Journal of**

Diabetes, 2017.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Early weaning is associated with higher neuropeptide y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 12, p. 2286–2295, 2012.

YOUNG, A. A. Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 31–45, jul. 2012.

ZANCHI, D. et al. The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety : A systematic review. v. 80, n. February, p. 457–475, 2017.

ZELTSER, L. M.; SEELEY, R. J.; TSCHÖP, M. H. **Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance** **Nature Neuroscience**, 2012.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Rv. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-920 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8940 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 18 de março de 2015.

Ofício nº 20/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Sandra Lopes de Souza**

Departamento de Anatomia

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.043927/2014-60

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, "Estresse perinatal e sistema serotoninérgico estudo das conseqüências sobre o comportamento alimentar na vida adulta."

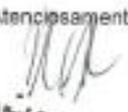
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals 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 e serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de criação da colônia Departamental de nutrição da UFPE. Animais: Ratos Heterogênico ; Linhagem; Swiss; Idade: 1-150; Peso: 220-300g Sexo; macho ; Nº total de animais: 120.

Atenciosamente


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCZ-UFPE
SAPE 2015/04

CCB: Integrar para desenvolver