



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO

LARISSA CAVALCANTI DO AMARAL ALMEIDA

**DESMAME PRECOCE E COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO: papel do
sistema opioide**

Recife
2019

LARISSA CAVALCANTI DO AMARAL ALMEIDA

DESMAME PRECOCE E COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO: papel do sistema opioide

Tese a ser apresentada ao programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Médicas, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Lopes de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda Alves Marcelino da Silva

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

- A447d Almeida, Larissa Cavalcanti do Amaral.
Desmame precoce e comportamento alimentar hedônico: papel do sistema opioide/ Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida. – 2019.
102 f.: il.
- Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCM, Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndices
1. Comportamento alimentar. 2. Desmame. 3. Peptídeos opióides. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

614

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-167)

LARISSA CAVALCANTI DO AMARAL ALMEIDA

DESMAME PRECOCE E COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO: papel do sistema opioide.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Médicas, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Aprovada em: 14 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra. Amanda Alves Marcelino da Silva (Examinador externo)
Universidade de Pernambuco

Profa Dra. Lisiane dos Santos Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra. Rhowena Jane Barbosa de Matos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra. Taisy Cinthia Ferro Cavalcante (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dedico esta tese ao Laboratório de Neuroplasticidade e Comportamento, por escolher caminhar de mãos dadas.

AGRADECIMENTOS

As boas energias que regem o mundo, o tempo e o sentimento.

A minha família por todo carinho, acolhimento e entendimento durante os anos que dediquei a esse doutorado.

Aos meus amigos, Jaciel, Renata, Mari, Gabriel e Rair, pelo amor de irmão que acolhe e incentiva. Vocês são a família que eu escolhi.

Aos amigos de laboratório pelos ensinamentos profissionais e, sobretudo, os ensinamentos pessoais sobre convivência com lealdade e respeito.

Aos meus alunos de iniciação científica, Paula, Bruna, Heloisa e Gabriel, vocês foram uma das melhores partes do meu doutorado. Eu tenho certeza que vocês ainda vão brilhar muito.

As minhas amigas de graduação por tanto carinho e apoio durante toda a jornada.

A professora Rhowena Matos pelo apoio estrutural e pessoal nos momentos difíceis. Jamais esquecerei do carinho, muito obrigada.

A professora Matilde Cesiana por me ensinar muito sobre companheirismo, lealdade e sinceridade.

A Posneuro pela dedicação a formação e acolhimento durante todos os momentos.

Ao laboratório da Professora Cláudia Lagranha por ter aberto as portas e ajudado em tudo que foi possível. Isso é uma atitude rara e bela. Muito obrigada.

Aos meus amigos de vida, Rafael e Vitor, por tanto amor recebido.

As minhas confidentes e apoiadoras, Letícia e Isabela.

A Patrícia Camilo, pelo amor, companheirismo e dedicação nesses anos todos. Você foi parte fundamental nisso tudo.

Ao meu sobrinho Fernando por me ensinar o que é o amor com um sorriso.

A minha avó Expedita por me ensinar a ser uma mulher livre.

A minha mãe por ser fonte inesgotável de amor, misericórdia e evolução. Um amor tão forte que me faz crescer na igualdade e nas diferenças. Em tudo ouço a voz da minha mãe.

A Amanda e Taisy por terem construído essa minha caminhada de mestrado e doutorado. Serei sempre grata pelo apoio, confiança e carinho. Essa estrada foi longa e cheia de pedras, eu não teria conseguido sozinha.

A minha Orientadora Sandra Lopes de Souza pelos ensinamentos. No tempo que dediquei a minha formação aprendi muito mais que neurociências, aprendi sobre acolhimento e amor. Viver é muito maior do que imaginamos. Obrigada por ter me ensinado sobre transformar os limões em limonada.

“A vida é mesmo coisa muito rara, uma bobagem, uma irrelevância, diante da eternidade do amor de quem se ama”(REIS, 2004)

RESUMO

Segundo a OMS, a amamentação exclusiva é recomendada até os seis meses de vida, e a partir dessa idade até os dois anos, suplementada com outros alimentos. Estudos em animais de laboratório demonstram que o desmame fora do tempo preconizado acarreta uma série de prejuízos a longo prazo no comportamento alimentar e suas vias neurocomportamentais, dentre elas o comportamento alimentar hedônico que controla a ingestão de alimentos palatáveis através de vias de recompensa. O controle hedônico é feito, principalmente, pela via mesolímbica que envolve diversas conexões nervosas e tem como estruturas principais a área tegmentar ventral (VTA), o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal. O sistema opioide tem sido amplamente estudado como importante modulador do sistema de recompensa, atuando na via mesolímbica em seus dois principais segmentos (Accumbens-VTA, VTA- Córtex pré-frontal) modulando o impacto hedônico imediato. Dessa forma o presente estudo teve como objetivo avaliar se o bloqueio da via opioide neonatal é capaz de interferir sobre o comportamento alimentar hedônico de ratos desmamados precocemente. Os grupos experimentais foram formados de acordo com o período do desmame de cada ninhada e o tratamento neonatal: Grupo Desmame Precoce(D15) – animais desmamados no 15º dia pós-natal; Grupo Controle (D30) - animais desmamados no 30º dia pós-natal; Grupo Desmame Precoce + Naltrexona(D15+NTX): animais D15 submetidos à administração de naltrexona (3mg/Kg) por via subcutânea. Os padrões comportamentais desses grupos foram divididos em 2 experimentos. O experimento 1 avaliou padrões comportamentais de ingestão alimentar de dieta palatável após estresse alimentar agudo, ingestão de alimento padrão de biotério após jejum de 8 horas e padrões comportamentais semelhante a depressão. No experimento 2 foram avaliados o padrão dos componentes hedônicos “Wanting”, “Learning” e “Liking”, o consumo de alimento palatável e o consumo de alimento palatável frente a dose aguda de naltrexona. No experimento 1, os grupos D15 ($n=8$; $138,3 \pm 18,6$; $p < 0,01$) e D15 + NTX ($n=8$; $139,3 \pm 18$; $p < 0,01$) apresentaram um aumento do tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle ($n=8$; $70,6 \pm 16,5$; $p < 0,01$). No experimento 2, o tempo de reatividade a sacarose o grupo D15 ($n=8$; $33,8 \pm 9,3$; $p < 0,05$) apresentou um menor tempo de reação quando comparado ao grupo D30 ($n=8$; $64,1 \pm 8$; $p < 0,05$). O grupo D15 + NTX ($n=8$; $62,3 \pm 9,8$; $p < 0,05$)

apresentou um aumento da reação a sacarose quando comparado ao grupo D15 (n=8; $33,8 \pm 9,3$; $p < 0,05$). A ingestão alimentar do grupo D15 (n=8; $13,36 \pm 1,56$; $p < 0,05$) foi maior que o grupo D30 (n=8; $10,34 \pm 2,70$; $p < 0,05$). O grupo D15 + NTX (n=8; $10,35 \pm 1$; $p < 0,05$) quando comparado com o D15 apresenta uma diminuição da ingestão alimentar. Os animais D15+ NTX demonstram na vida adulta ser resistente a aplicação aguda de naltrexona, no consumo alimentar palatável intergrupos após aplicação aguda de naltrexona, o grupo D15 (n=8; $7,13 \pm 2,18$; $p < 0,05$) apresentou um aumento do consumo alimentar em comparação ao grupo D30 (n=8; $4,74 \pm 1,09$; $p < 0,05$). Já o grupo D15+ NTX (n=8; $10,92 \pm 2,12$; $p < 0,05$) apresentou um aumento do consumo quando comparado ao grupo D15 e ao grupo D30. Dessa forma, podemos concluir que o desmame precoce promove alterações nos mecanismos de “Liking” do comportamento alimentar hedônico envolvido com o sistema opioide.

Palavras-chave: Comportamento alimentar. Desmame. Peptídeos opioides.

ABSTRACT

Early weaning is a global health problem. According to the WHO, exclusive breastfeeding is recommended up to six months of age, and from that age up to two years, supplemented with other foods. Breast milk is the most complete nutritional source to be provided for the proper growth and development of infants and children. Studies in laboratory animals show that the weaning over time suggests a series of long-term losses in eating behavior and its neurobehavioral pathways, among them the hedonic eating behavior that controls the intake of palatable foods through reward routes. The hedonic control is made mainly by the mesolimbic pathway that involves several nerve connections and has as main structures the ventral tegmental area (VTA), the nucleus accumbens and the prefrontal cortex. The opioidergic system has been widely studied as an important modulator of the reward system, acting on the mesolimbic pathway in its two main segments (Accumbens-VTA, VTA-Prefrontal Cortex) modulating the immediate hedonic impact. to assess whether blockade of the neonatal opioidergic pathway is capable of interfering with the hedonic eating behavior of pre-weaned rats. The experimental groups were trained according to the weaning period of each litter. The animals were separated according to day of weaning and neonatal treatment: Early Weaning Group (D15) - animals weaned on the 15th postnatal day; Control Group (D30) - animals weaned on the 30th postnatal day; Early Weaning Group + Naltrexone (D15 + NTX): D15 animals submitted to subcutaneous administration of naltrexone (3mg / kg). The behavioral patterns of these groups were divided into 2 experiments. Experiment 1 evaluated behavioral patterns of dietary intake of palatable diet after acute food stress, standard animal feed intake after 8 hours fasting and behavioral patterns similar to depression. In experiment 2, the standard of the "Wanting", "Learning" and "Liking" components of the food reward, the consumption of palatable food and the consumption of palatable food against the acute dose of naltrexone were evaluated. In the experiment 1, groups D15 and D15 + NTX presented an increase of the immobility time when compared to the control group . In the experiment 2, the reaction time to sucrose group D15 presented a shorter reaction time when compared to group D30. The D15 + NTX group showed an increase in sucrose reaction when compared to group D15. The absolute dietary intake of the D15 group was higher than the D30 group. The D15 + NTX group when compared to D15

presented a decrease in food intake. The D15 + NTX animals demonstrated in adult life to be resistant to the acute application of naltrexone, in the palatable food intake intergroups after acute application of naltrexone, the group D15 presented an increase in food consumption compared to the D30 group. The D15 + NTX group showed an increase in consumption when compared to group D15 and group D30. Thus, we can conclude that early weaning promotes changes in the "Liking" mechanisms of the hedonic eating behavior involved with the opioidergic system.

Keywords: Feeding behavior. Opioid peptides. Weaning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do modelo clássico de resposta ao estresse.....	23
Figura 2 -	Representação esquemática dos locais onde os receptores μ -opioide podem desinibir neurônios da área tegmental ventral.....	36
Figura 3 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre a evolução ponderal em ratos que foram desmamados precocemente.....	46
Figura 4 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre o consumo alimentar de dieta palatável após estresse alimentar agudo em ratos que foram desmamados precocemente.....	47
Figura 5 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre o consumo alimentar de dieta palatável após 8 horas de privação em ratos que foram desmamados precocemente.....	48
Figura 6 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre comportamento semelhante a depressão em ratos que foram desmamados precocemente.....	49
Figura 7 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre teste de motivação alimentar em ratos que foram desmamados precocemente.....	50
Figura 8 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre teste de Reatividade ao paladar em ratos que foram desmamados precocemente.....	51
Figura 9 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre a ingestão alimentar palatável em ratos que foram desmamados precocemente.....	52
Figura 10 -	Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre o consumo alimentar de dieta palatável após aplicação aguda de Naltrexona em ratos que foram desmamados precocemente.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	LACTAÇÃO	19
2.2	DESMAME PRECOCE.....	21
2.2.1	Desmame precoce e estresse	21
2.2.2	Desmame precoce e o sistema límbico	23
2.2.3	Desmame precoce e padrões comportamentais	25
2.3	O SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR E A PALATABILIDADE.....	28
2.4	A PALATABILIDADE E OS ESTÍMULOS SENSORIAIS	29
2.5	CONTROLE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO	31
2.6	OPIOIDES E COMPORTAMENTO ALIMENTAR	32
3	HIPÓTESE	38
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL.....	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1	ANIMAIS.....	40
5.2	DESMAME PRECOCE.....	40
5.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
5.4	DROGA	41
6	EXPERIMENTO 1: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DE ESTRESSE E DEPRESSÃO.....	42
6.1	PESO CORPORAL.....	42
6.2	CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL APÓS UM ESTRESSE AGUDO.....	42
6.3	CONSUMO ALIMENTAR EM RESPOSTA A PRIVAÇÃO ALIMENTAR DE 8HS.....	42
6.4	TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA	43
7	EXPERIMENTO 2: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DO SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR...	44
7.1	TESTE DO CORREDOR (RUNWAY TASK INCENTIVE)	44
7.2	TESTE DE REATIVIDADE AO PALADAR	44

7.3	CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL	45
7.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
8	RESULTADOS.....	47
8.1	EXPERIMENTO 1: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DE ESTRESSE E DEPRESSÃO	47
8.1.1	Peso corporal.....	47
8.1.2	Consumo de alimento palatável após estresse agudo	48
8.1.3	Consumo alimentar após 8 horas de privação	48
8.1.4	Teste de suspensão pela cauda.....	49
8.2	EXPERIMENTO 2: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DO SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR	50
8.2.1	Teste do corredor (Runway Task incentive)	50
8.2.2	Teste de reatividade ao paladar	51
8.2.3	Consumo de alimento palatável.....	52
8.2.4	Consumo de alimento palatável após aplicação aguda de Naltrexona .	53
9	DISCUSSÃO	55
9.1	EXPERIMENTO 1: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DE ESTRESSE E DEPRESSÃO	55
9.2	EXPERIMENTO 2: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DO SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR	59
10	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A- CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL	82
	APÊNDICE B- ARTIGO CIENTÍFICO PRODUTO DIRETO DA TESE SUBMETIDO A PHYSIOLOGY & BEHAVIOR.....	83

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a amamentação exclusiva é recomendada até os seis meses de vida, e a partir dessa idade até os dois anos, suplementada com outros alimentos (OMS, 2017). O leite materno é a fonte nutricional mais completa a ser fornecida para o crescimento e desenvolvimento adequado de bebês e crianças, pois sua composição é balanceada com macronutrientes, micronutrientes, hormônios e anticorpos que dão suporte adequado às necessidades nutricionais e à imunoproteção a ser desenvolvida em crianças (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). Além disso, o contato físico materno é importante para troca de estímulos que vai garantir que o filho se adeque ao ambiente em que está sendo desenvolvido, isso ocorre desde a proteção social à maturação de características neurais (KOJIMA et al., 2012a).

A maturação das conexões neuronais dos filhos através de estímulos maternos vai acontecer primordialmente por mecanismos de aprendizado (WALKER et al., 2004). O ambiente e suas variações vão transmitir importantes informações sobre o meio que a nutriz estará inserida e o contato físico e o aporte nutricional do leite serão os principais estímulos sensoriais utilizados para transferir isso para os filhos (BARRETT; FLEMING, 2011; SULLIVAN; HOLMAN, 2010). A capacidade de desenvolver as vias neurocomportamentais é inata nos mamíferos, porém a construção do padrão que irá maturar está diretamente ligada a respostas a estímulos ambientais maternos específicos (MARLER, 2004). Todos esses mecanismos protetivos maternos estão associados a uma melhor adaptação da sua prole ao ambiente onde está sendo inserida, reduzindo, assim, as taxas de morbimortalidade infantil e as doenças que irão repercutir na vida adulta (KALANDA; VERHOEFF; BRABIN, 2006; KOLETZKO et al., 2009).

O desmame natural é um processo gradual ocorrido nos mamíferos que consiste na introdução da procura por alimentos disponíveis no ambiente e na diminuição da alimentação por leite materno (WOODSIDE et al., 2012). Um indivíduo é considerado completamente desmamado, uma vez que não é mais alimentado por qualquer tipo de aleitamento (LEVY et al., 2004). Já o desmame precoce é entendido como uma quebra brusca da relação persistente mãe-filho, antes do

período considerado ótimo para aquisição de padrões maduros de desenvolvimento infantil (SMITH et al., 2010; TOWNSEND; PITCHFORD, 2012).

O leite materno está associada à redução do risco de desenvolver vários distúrbios metabólicos, como obesidade e / ou sobrepeso (MARSEGLIA et al., 2015). Diversos estudos demonstraram que a obesidade infantil está associada a uma redução no tempo ideal de amamentação (OWEN et al., 2005). Além disso, Horta e colaboradores em 2007 também mostraram que o leite materno reduz em 22% o risco de obesidade na vida adulta. Isso ocorre, pois, o leite materno tem a capacidade de autorregular a ingestão de alimentos e ajustar o balanço energético do indivíduo (GAHAGAN, 2012). Essa regulação energética ocorre precocemente no período neonatal e na infância e pode orientar o indivíduo na regulação do apetite e da preferência por determinados alimentos e sabores (GAHAGAN, 2012).

Em ratos, o início da fase de desmame ocorre no 21º dia e é completada no 30º dia. Em contrapartida, até a segunda semana de vida o controle da ingestão de leite ocorre exclusivamente pela mãe pois a ninhada ainda não tem o controle neuromotor amadurecido para o consumo de alimentos sólidos (iniciando apenas no 14º dia) (LEVY et al., 2004). Em um ambiente padrão de experimentação animal, as ratas tendem a ficar em média 12 horas com seus filhos até o período do completo desmame (LEVY et al., 2004). Animais que são submetidos a ruptura desse processo durante os 10 primeiros dias apresentaram um aumento de respostas neuroendócrinas a fatores estressores, além de aumentar padrões comportamentais associados com a ansiedade e a interação social (ITO et al., 2006; KUHN; SCHANBERG, 1998). Alguns padrões-chaves de interação social observados na vida adulta estão alterados em animais que foram desmamados antes do tempo. Um estudo demonstrou que esses animais apresentaram uma diminuição do comportamento amistoso de luta e do exploratório na vida adulta (ITO et al., 2006). Além disso, uma série de estudos demonstram que os animais desmamados precocemente quando submetidos a testes comportamentais ligados a ansiedade, tais como labirinto elevado em cruz, *hole-board* e campo aberto, indicam um efeito duradouro do medo frente a acontecimentos e desafios quando submetidos a novos ambientes (KANARI et al., 2005). Estudos pregressos do nosso grupo de pesquisa demonstrou que animais submetidos ao desmame precoce apresentam aumento o

consumo de dieta rica em gordura e aumenta a preferência por alimento palatável (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

As vias neuronais que coordenam o comportamento alimentar são impulsionadas por diversos fatores. O ato de comer pode ser desencadeado por necessidades metabólicas, pela unidade hedônica (através de mecanismos de recompensa) ou uma interação das duas unidades (através de diversos circuitos neurais que realizam essa interface) (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). As vias hedônicas são estimuladas por alimentos palatáveis, ricos principalmente em lipídios e carboidratos (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). O sistema de recompensa alimentar está associado aos eventos psicológicos e neurobiológicos que produzem a sensação consciente e inconsciente de prazer no indivíduo (SALAMONE; CORREA, 2012). Quando essa via é ativada aumenta a probabilidade futura de uma resposta comportamental que produza um resultado benéfico (prazer), ou seja um reforço positivo (SALAMONE; CORREA, 2012).

O sistema mesolímbico é o principal responsável pelo controle hedônico do comportamento alimentar e está particularmente alterado em indivíduos que sofreram desmame precoce, sobretudo nas vias que reforçam mecanismos de adicção que utilizam as mesmas vias da recompensa alimentar (BRITT; WISE, 1983; GOEDERS; GUERIN, 1996a; MELA, 2006). Estudos demonstram que indivíduos que não foram amamentados corretamente tendem a apresentar uma maior propensão a drogas de abuso, como álcool e cocaína (DAOURA; HAAKER; NYLANDER, 2011; KIKUSUI; FACCIDOMO; MICZEK, 2005).

A transmissão opioidérgica possui um importante papel nesse sistema, orientando o impacto hedônico dos alimentos (LE MERRER et al., 2009). Os peptídeos opioides e seus receptores estão amplamente distribuídos na circuitaria neural envolvida nas diretrizes sensoriais, metabólicas e integrativas do comportamento alimentar (LE MERRER et al., 2009). A administração de opioides no núcleo accumbens aumenta a ingestão alimentar de uma solução rica em sacarose e da preferência por alimentos hiperlipídicos (ZHANG; KELLEY, 2002). Dessa forma, os opioides estão diretamente envolvidos na amplificação da percepção hedônica de uma recompensa alimentar (HAVERMANS, 2011). Em um estudo com humanos que foram administrados agonistas de opioides foi encontrado

um aumento da ingestão de alimentos considerados palatáveis (teor elevado de gordura e de açúcar) (YEOMANS; GRAY, 2002). Estudos clínicos com antagonistas de opioides, em especial naloxona e naltrexona, em indivíduos obesos demonstram uma redução na ingestão alimentar (THOMPSON; WELLE; LILAVLVAT, 1982; TRENCHARD; SILVERSTONE, 1983; YEOMANS; GRAY, 2002). Além desses dados, estudos genéticos indicam que variações no gene que codifica o receptor humano μ -opioide (OPRM1) estão associadas com a mudança na preferência alimentar por alimentos ricos em gordura (HAGHIGHI et al., 2014).

Apesar de muitos estudos apontarem para as diversas alterações comportamentais ligadas ao tempo de amamentação, há poucos artigos na literatura sobre desmame precoce e de que forma essas alterações se apresentam no sistema de recompensa alimentar, sobretudo na via opioidérgica. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se o bloqueio da via opioidérgica neonatal é capaz de interferir sobre o comportamento alimentar hedônico de ratos desmamados precocemente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LACTAÇÃO

No período da Lactação, a nutriz vai exercer um papel crucial no desenvolvimento de sua prole (GLUCKMAN; HANSON, 2004). Os eventos que ocorrem nessa fase vão influenciar a maturação de padrões bioquímicos, endócrinos e neurocomportamentais da sua ninhada (ITO et al., 2006; NAKAMURA et al., 2008; TOWNSEND; PITCHFORD, 2012). As influências maternas virão sobre duas principais perspectivas: a nutricional e o contato físico mãe-filhote. Em um ambiente padrão, ratos de laboratório costumam depender exclusivamente da mãe para a aquisição de alimentos durante as duas primeiras semanas da lactação e passam mais de doze horas diárias de contato físico intenso até o período de desmame entre 23-33 dias pós-parto (CRAMER; THIELS; ALBERTS, 1990; PLAUT; DAVIS, 1972).

A forma como o lactente vai obter o leite materno segue uma sequência estereotipada de condutas cujo início ocorre pela fixação do mamilo, seguindo pela sucção do leite e cessação da sucção (HALL; ROSENBLATT, 1978). A produção, manutenção e a descida do leite, bem como o desenvolvimento contínuo da glândula mamária, são hormônios dependentes. A maior contribuição para o controle da produção do leite é da Prolactina e da descida do leite é oxitocina (GOREWIT et al., 1983; GREGERSON, 2006). Na amamentação, a síntese e a liberação de ambos os hormônios ocorrem através de um reflexo neuroendócrino iniciados por estímulos exteroceptivos da sucção, olfação e audição (HATTON; WANG, 2008).

O período de amamentação pode ser dividido em duas principais fases. Na primeira a ingestão de alimentos é feita exclusivamente pelo leite e na segunda o leite é gradualmente retirado e começa a ingestão de alimentos sólidos. (CRAMER; THIELS; ALBERTS, 1990). Nas duas primeiras semanas de vida, o controle da ingestão alimentar dos ratos é totalmente dependente da mãe e a fixação do mamilo pela prole é direcionada pela olfação, visto que os animais não abriram os olhos ainda (AL AÏN et al., 2013; LEVY et al., 2004; SCHWARTZ; ROWE, 1976). A partir da segunda semana, os animais tendem a apresentar uma autonomia no controle da

ingestão alimentar e começam a introduzir alimentos sólidos nas suas refeições (PLAUT; DAVIS, 1972). O desmame espontâneo ocorre no fim da terceira semana, cessando o consumo de leite (CRAMER; THIELS; ALBERTS, 1990).

O vínculo mãe- filhote é essencial para que o processo dinâmico de troca de estímulos entre eles ocorra adequadamente garantindo que a prole evolua do estágio de intenso cuidado à total independência(KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007b; KOJIMA et al., 2012b). O modo como essa interação transcorre dependerá de vários fatores como: a carga genética da mãe e da prole, experiências passadas da mãe e o ambiente pré-natal dos filhotes(JAFFEE; PRICE, 2012).

A maturação das conexões neuronais dos filhotes através de estímulos maternos vai acontecer primordialmente por mecanismos de aprendizado(WALKER et al., 2004). O ambiente e suas variações vão transmitir importantes informações sobre o meio que a nutriz estará inserida e o contato físico será um dos principais estímulos sensoriais utilizados para transferir isso para a prole(BARRETT; FLEMING, 2011; SULLIVAN; HOLMAN, 2010). A capacidade de desenvolver os órgãos dos sentidos é inata nos mamíferos, porém a construção do padrão que irá maturar está diretamente ligada a respostas a estímulos ambientais específicos(MARLER, 2004).

O sistema ocular de ratos é um bom exemplo desses estímulos pois, ao nascer, possui células corticais visuais inatas que constituem um complexo visual rudimentar e a vivência com a mãe e seus incentivos próprios de aprendizado é que vão maturando esse sistema(GOODALE; GOODALE, 2014). Já a memória olfativa de um rato começa a ser formada quando suas nutrizas desenvolvem o comportamento de lambar a ninhada(KEVERNE; CURLEY, 2008). Em um estudo sobre o desenvolvimento do paladar de ratos na lactação foi observado que animais expostos a determinados odores que ativavam neurônios sensoriais específicos tinham um aumento glomerular e uma significativa preferência pelo sabor associado quando comparado a ratos não expostos.(TODRANK; HETH; RESTREPO, 2011).

O sistema sensorial de neonatos, incluindo estímulos térmicos, gustativos, olfativos e táteis, atua como uma entrada do meio ambiente ao cérebro em formação que vai organizar uma resposta comportamental e fisiológica adequada(ZHANG;

CAI, 2008). 'Essas respostas englobam desde padrões motores envolvidos na busca para encontrar a ninhada, à vasoconstricção da pele que impede a perda de calor e uma secreção adequada de hormônios para uma situação desencadeada(KUHN; SCHANBERG, 1998). A interação da nutriz com sua ninhada, durante a lactação, é um processo complexo, contínuo e recíproco que influencia tanto o comportamento materno quanto a fisiologia infantil(LUCION; BORTOLINI, 2014).

O cérebro dos filhotes de mamíferos decide sobre a organização fisiológica pré-programada mais adequada para o meio ambiente que está sendo desenvolvido s(MORGANE et al., 1993). Nesse caso, atua como um sistema de tomada de decisão de monitorização e que responde as ausências e alterações dos estímulos sensoriais através da ativação de circuitos neuronais apropriados(MORGANE et al., 1993).

2.2 DESMAME PRECOCE

O desmame natural é considerado um processo gradual ocorrido nos mamíferos que consiste na introdução da procura por alimentos disponíveis no ambiente e na diminuição da alimentação por leite materno (WOODSIDE et al., 2012). Um indivíduo é considerado completamente desmamado, uma vez que não é mais alimentado por qualquer tipo de aleitamento(LEVY et al., 2004). O desmame é considerado precoce quando há uma interrupção atemporal e irregular do aleitamento(ROCHA et al., 2014). O desmame precoce, então, vai ser considerado como a quebra da relação entre a nutriz e sua prole, que inclui a cessação da amamentação e a separação física da prole com o rompimento da proteção social pela mãe. Vários estudos demonstram que o desmame precoce, em específico o tardio (a partir do 14 dia), implica diversas modificações nos padrões neurocomportamentais, hormonais e ontológicos dos mamíferos(ITO et al., 2006; KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007a; TOWNSEND; PITCHFORD, 2012).

2.2.1 Desmame precoce e estresse

O modelo clássico de resposta ao estresse compreende a estimulação do eixo Hipotálamo- Pituitária- adrenal (HPA). A porta de entrada para a resposta neuroquímica ao estresse é a ativação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela glândula pituitária, que por sua vez, estimula a adrenal a liberar glicocorticoides, como a corticoesterona em roedores e o cortisol em humanos (KIKUSUI; MORI, 2009). Os níveis circulantes de glicocorticoides estão envolvidos num mecanismo de feedback negativo no eixo HPA, ou seja, seu aumento atua inibindo a liberação de ACTH e CRH.(LIU et al., 1997).O desmame precoce, ou até mesmo a diminuição do contato físico temporário com a mãe, é considerado um fator estressor intenso que induz mudanças a longo prazo na atividade do eixo HPA (KIKUSUI et al., 2006; KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007a).

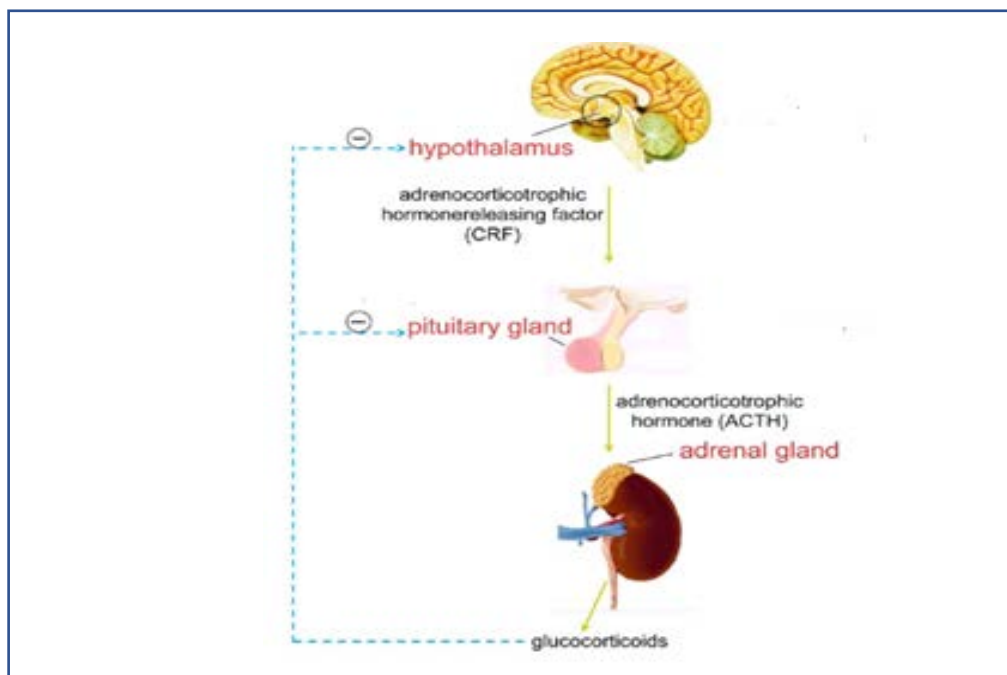
Animais que são submetidos a diminuição do contato físico (180 minutos) com a nutriz nas suas primeiras semanas de vida pós- natal apresentam um aumento de RNAm de CRH, em condições basais , na vida adulta(PLOTSKY; MEANEY, 1993). A separação da mãe precocemente diminui comportamentos maternos com a prole, tais como lambar e limpar, causando uma alteração na expressão de receptor para Glicocorticoides (GR) no hipocampo(LIU et al., 1997). Os níveis circulantes de glicocorticoides são rigidamente controlados pelo seu mecanismo de feedback negativo. Esse processo ocorre através da ativação induzida de receptores mineralocorticoides localizados no Hipocampo e/ou ativação de GR que estão amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central, com importante distribuição na adenohipófise (ROSENFELD et al., 1993).

Ratos adultos que foram desmamados precocemente quando submetidos ao labirinto em cruz elevado, apresentam aumento significativos da corticosterona após 45 minutos do teste, mas não aos 20 minutos, revelando sua alteração no mecanismo de feedback negativo dos glicocorticoides (KIKUSUI et al., 2006). Além disso, a expressão de GR encontra-se elevada na terceira semana de vida pós-natal e diminuída na oitava semana (KIKUSUI et al., 2006). Uma maior resposta a glicocorticoides induz a morte celular, por apoptose, no hipocampo(SCHMIDT et al., 2004). O aumento da expressão de GR na vida juvenil, pode induzir uma expressão de GR diminuída na vida adulta, bem como uma maior

resposta endócrina ao estresse pelo aumento da corticosterona(KIKUSUI et al., 2006). Além dos impactos a longo prazo, também são demonstradas alterações imediatamente após os desmame. Os ratos que foram desmamados precocemente (14 dias) apresentam um aumento dos níveis de corticosterona até 48 horas após o desmame, em contrapartida, os ratos que foram desmamados naturalmente (21 dias) retornam aos níveis basais de corticosterona já na primeira hora(KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009).

O vínculo mãe-filhote é um dos principais indutores para a expressão de receptores de glicocorticoides nos tecidos-alvos(LIU et al., 1997). Dessa forma, as diferentes formas de resposta ao estresse de animais que apresentaram ou não uma quebra de vínculo mãe-filhote parecem estar associadas a sensibilidade ao feedback negativo de glicocorticoides(LIU et al., 1997).

Figura 1 - Representação esquemática do modelo clássico de resposta ao estresse



Fonte: Current Neuropharmacology

2.2.2 Desmame precoce e o sistema límbico

O sistema límbico é constituído por um conjunto de estruturas interligadas entre si, como o hipocampo, tálamo, hipotálamo, amígdala, giro

cingulado e área pré-frontal, e com demais estruturas do sistema nervoso responsáveis pelas emoções e comportamentos sociais (LÖVBLAD; SCHALLER; ISABEL VARGAS, 2014).

Períodos repetidos de privação materna, durante a lactação, alteram os sistemas centrais de CRH(PLOTSKY; MEANEY, 1993). Em adultos, animais separados da mãe demonstram um aumento das respostas emocionais de temor frente a novidades(CALDJJ et al., 2000),respostas exageradas ao stress(PLOTSKY; MEANEY, 1993) e aumento da sensibilização a ação da cocaína. A exposição aguda ao estresse e o aumento dos níveis de corticoesterona facilitam a aquisição e a procura por cocaína, em ratos adultos(GOEDERS; GUERIN, 1996a). A administração de inibidores da síntese de corticoesterona e a adrenalectomia estão envolvidas com a reversão desse efeito(DEROCHE et al., 1992; GOEDERS; GUERIN, 1996b).

Essas alterações estão associados com o aumento da expressão de RNAm do CRH no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) e na amígdala central(LADD et al., 2000; PLOTSKY; MEANEY, 1993). Além disso, são encontrados aumento dos níveis do receptor para CRH no *Locus Ceruleus* e nos núcleos da Rafe(CHARLOTTE O. LADD, MICHAEL J. OWENS, 1996; LADD et al., 2000). A expressão de CRH no PVN está sujeita a regulação inibidora dos glicocorticoides(LADD et al., 2000). Animais que tiveram interrupção dos cuidados maternos precoces apresentam um diminuição da expressão do receptor para glicocorticoides no hipocampo e no córtex frontal, regiões que são conhecidas por mediar os efeitos inibitórios na síntese de CRH no PVN(DALLMAN et al., 1994; DE KLOET et al., 1998; DIORIO; VIAU; MEANEY, 1993).

Ratos submetidos a separação materna também mostram uma diminuição dos níveis do receptor GABA_A nos corpos celulares noradrenérgicos do *Locus Ceruleus* e também nos receptores centrais para benzodiazepina no núcleo central e lateral da amígdala(CALDJJ et al., 2000). O sistema GABA/ Benzodiazepina serve para inibir a síntese de CRH na amígdala e reduzir as respostas noradrenérgicas ao estresse(CALDJJ et al., 2000).

Os glicocorticoides tem um papel crítico na sinalização para o início e manutenção da taxa de formação da mielina (CHAN; PHILLIPS; GLASER, 1998). A galactosilceramida, importante componente cerebral específico da mielina, foi encontrada em níveis elevados na quinta semana de ratos desmamados precocemente (ONO et al., 2008). Essa alteração foi encontrada apenas na amígdala, mas não no córtex pré-frontal e no hipocampo. Além disso, a microscopia eletrônica demonstrou que há um aumento no número e diminuição no diâmetro dos axônios mielinizados na parte anterior da Amígdala basolateral(ONO et al., 2008). Esses resultados podem estar diretamente ligados ao aumento do comportamento ansioso em animais desmamados, outrossim a amígdala está fortemente associada com os padrões comportamentais semelhantes aos da ansiedade em ratos(ITO et al., 2006; MAH; SZABUNIEWICZ; FIOCCO, 2016).

Outro fator importante para regular adequadamente o desenvolvimento cerebral é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BNDF). Ratos que foram submetidos a desmame precoce apresentaram menos BNDF no hipocampo, na terceira semana de vida pós nata(KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). Esses animais apresentavam também menos células imunorreativas a Bromodeoxiuridina (BrdU), importante marcador de proliferação celular, no giro denteado na 3ª, 5ª e 8ª semana da vida(KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). O BNDF e a neurogênese são encontrados diminuídos quando os glicocorticoides estão num nível mais elevado, dessa forma o desmame precoce parece impor efeitos inibitórios sobre a proliferação celular prolongada no hipocampo.

2.2.3 Desmame precoce e padrões comportamentais

Os padrões comportamentais que os roedores exibem são sequencias estereotipadas de ações que estão apontadas como respostas para influências do ambiente externo e interno, visando sua autopreservação e sobrevivência (GLUCKMAN; HANSON, 2004). Durante o desenvolvimento normal dos ratos, os filhotes são capazes de comer, manter a temperatura corporal e evacuar por si só, a partir da segunda semana de vida pós-natal (período em que o organismo deixa de ser hiporresponsivo ao estresse)(LEVINE et al., 1991; PLAUT; DAVIS, 1972). A

partir desse ponto e durante todo o processo de desmame, o sistema neuroendócrino para maturação de aspectos comportamentais torna-se particularmente vulnerável a qualquer fator de estresse. Assim, o estabelecimento do desmame precoce influencia o desenvolvimento fisiológico e neurocomportamental em ratos(KIKUSUI; MORI, 2009).

O comportamento de brincar é desenvolvido nos ratos antes do desmame enquanto os seus irmãos estão no mesmo ambiente(BIRKE; SADLER, 1987). A expressão desse comportamento parece estar associada diretamente com o vínculo mãe-filhote, especialmente com a frequência de lambidas ano-genital da mãe(PARENT; MEANEY, 2008). O desmame precoce diminui a taxa da brincadeiras de combate entre os ratos juvenis, apresentando também alterações nos padrões de limpeza social e autolimpeza, e diminui o comportamento exploratório na vida adulta(SHIMOZURU et al., 2007). Essa diminuição comportamental pode estar envolvida com o aumento de comportamentos similares a ansiedade que estão relacionados com a redução de tempo gasto pelos animais desmamados precocemente na interação social entre eles(SHIMOZURU et al., 2007).

Vários estudos demonstram através testes comportamentais clássicos que o desmame precoce está associado a comportamentos semelhantes a ansiedade em roedores adultos(KANARI et al., 2005). No teste do labirinto em cruz elevado, ratos adultos desmamados precocemente apresentam um menor tempo e frequência nos braços abertos, permanecendo significativamente no braços fechados, o que indica um aumento dos níveis de ansiedade desses animais(KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007b). No teste de placa perfurada, os ratos desmamados precocemente apresentaram menos tempo e frequência de mergulhos de cabeça, também indicando um aumento de comportamento similar a ansiedade(ITO et al., 2006).

Animais que possuem pares sexuais monogâmicos apresentam forte agressão territorial buscando a proteção dos seus pares(BIRKE; SADLER, 1987). Quando outro macho se aproxima do seu território eles apresentam padrões comportamentais agressivos, tais como mordidas, ataques laterais e movimentos repetidos com a cauda(KOOLHAAS et al., 2013). Animais desmamados apresentam a frequência de ataques a um intruso no seu território semelhante aos naturalmente

desmamados, porém com aumento da frequência individual de mordidas (NAKAMURA et al., 2003). Essa mudança comportamental pode refletir num padrão comportamental ansioso em relação a um animal não familiar.

Outro fator que se apresenta bastante modificado é a resposta a um agente estressor ambiental, especialmente a privação alimentar (NAKAMURA et al., 2008). No teste comportamental de exposição a um intruso, amplamente utilizado para a investigação de padrões sociais como a agressividade (KOOLHAAS et al., 2013), camundongos normalmente desmamados apresentaram quase o dobro de ataques agressivos após interação inicial de 5 minutos que os desmamados precocemente. Porém, esses animais desmamados antes do tempo apresentaram-se mais agressivos que os animais padrão quando ambos foram submetidos a uma privação alimentar anterior (NAKAMURA et al., 2008).

O comportamento alimentar é particularmente vulnerável a fatores ambientais no período de lactação que é uma etapa crítica de maturação de padrões neurais e hormonais da prole (GLUCKMAN; HANSON, 2004; MORGANE et al., 1993). O teste comportamental de saciedade é usado para aferir o ponto e as características da saciedade de um animal e seu comportamento alimentar homeostático (ISHII et al., 2003). O desmame precoce está associado a um retardo do ponto de saciedade quando comparado a animais que foram naturalmente desmamados. Além disso esses animais apresentam um aumento da preferência alimentar por dietas hipercalóricas e por alimentos palatáveis (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011). Tomados em conjunto esses dados sugerem que o desmame precoce altera padrões-chaves comportamentais e microestruturais da alimentação.

Estudos com desmame precoce, sem a retirada da nutriz, pela inibição da produção de prolactina também estão associados com alterações estruturais no controle central do comportamento alimentar (YOUNES-RAPOZO et al., 2015). Ratos que tiveram sua produção de leite suprimida por Bromocriptina, agonista de receptores dopaminérgicos, apresentaram na vida adulta um aumento da densidade de fibras do orexigênico neuropeptídeo Y (NPY) nos núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo. Além disso foi encontrada um aumento de astrogliose nos núcleos Arqueados, paraventricular e hipotálamo lateral (YOUNES-RAPOZO et al.,

2015). Esses dados nos sugerem que o desmame precoce atua a longo prazo em uma importante população neuronal relacionada com a ingestão alimentar e que apresenta processos inflamatórios hipotalâmicos.

2.3 O SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR E A PALATABILIDADE

O sistema de recompensa alimentar modula o incentivo de prazer na ingestão alimentar e é dividido em três constituintes fundamentais: o incentivo hedônico relacionado com o nível de palatabilidade do alimento (*Liking*), o incentivo motivacional de procura pelo alimento (*Wanting*) e o incentivo de memória que prevê e faz associações com experiências passadas do alimento (*Learning*) (BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009). Esses componentes estabelecem a experiência multissensorial da ingestão de alimentos palatáveis.

A palatabilidade alimentar é definida como a avaliação hedônica positiva das propriedades sensoriais dos alimentos (YEOMANS, 1998). Os alimentos palatáveis são pensados para influenciar a ingestão através da ativação de vias motivacionais hedônicas, atuando sobre a ingestão mais em estado de saciedade que em estado de fome (YEOMANS, 1998). O limiar de recompensa para produção de respostas cerebrais hedônicas se mostra gradualmente elevada em animais com acesso diário a dietas altamente palatáveis (MELA, 2006). Ou seja, ao longo do tempo, o consumo de dieta palatável pode conduzir a redução da capacidade de recompensa do cérebro. Essas alterações têm sido discutidas por possivelmente estar associado com o balanço energético positivo relacionado com a obesidade, o aumento da busca por estímulos de recompensa levam a uma tendência a comer alimentos palatáveis em excesso (MELA, 2006).

O consumo de alimentos palatáveis participa da regulação da ingestão de nutrientes a curto prazo (RUI, 2013). Essa ingestão é controlada por padrões comportamentais chave como a escolha do alimento, a quantidade de alimento consumido dentro de uma refeição até o ponto de saciação e o intervalo de saciedade entre a supressão da fome até a futura refeição (CHAMBERS; MCCRICKERD; YEOMANS, 2015).

A saciedade e a saciação são apoiadas na avaliação cognitiva anterior do alimento, sua disponibilidade e qualidade, e os sinais pós-ingestivos e pós-absorvativos gerados pela ingestão e digestão do alimento (BERTHOUD, 2007). A experiência inicial de ingestão é importante para que os animais avaliem as características sensoriais de um alimento, fazendo a associação adequada entre a experiência precoce e os efeitos pós ingestivos (BERTHOUD, 2007). O cheiro, o sabor e a visão dos alimentos estimulam o sistema nervoso central em áreas - associadas com recompensa, memória e aprendizado, atenção, e áreas associadas a comportamento alimentar homeostático, que em conjunto desencadeiam uma série de respostas fisiológicas como a salivação, a secreção de ácido gástrico e a liberação de hormônios gastrointestinais. (BRUNSTROM, 2007; ROGERS; RAIMUNDO; MISIEWICZ, 1993; WOOLEY; WOOLEY, 1973) Essa cascata de reações indica que os sinais sensoriais previamente apreendidos desempenham um papel fundamental na otimização de nutrientes.

2.4 A PALATABILIDADE E OS ESTÍMULOS SENSORIAIS

Uma das primeiras informações ambientais que chega ao sistema nervoso central na hora da alimentação é a estimulação visual (WANSINK, 2004). A visão do alimento nas proximidades é suficiente para desencadear o início da refeição, através de respostas fisiológicas condicionadas como a salivação, a secreção de ácido gástrico e a liberação de hormônios gastrointestinais (WANSINK, 2004). Além disso, a avaliação visual recruta o aprendizado pregresso, evocando crenças e expectativas sobre as propriedades saciantes do alimento, que pode orientar nas decisões da quantidade e qualidade da refeição (WADHERA; CAPALDI-PHILLIPS, 2014). Em geral, as indicações visuais vão além de simplesmente iniciar uma refeição e também são determinantes na seleção, em todo processo de ingestão e o tempo de saciedade pós-consumo (WADHERA; CAPALDI-PHILLIPS, 2014). Uma vez iniciada a refeição, o indivíduo continua com o contato visual para determinar o tamanho da refeição (MARCHIORI; WAROQUIER; KLEIN, 2011). As características visuais sobre a quantidade de alimento disponível no prato direciona o feedback fisiológico de consumo alimentar (ROBINSON et al., 2015).

Outro estímulo que participa como importante sinal sensorial para a palatabilidade é o olfatório (SMALL; PRESCOTT, 2005). Os odores dos alimentos palatáveis são identificados mesmo antes dos alimentos serem avaliados visualmente (STEVENSON, 2009). Assim como os estímulos visuais, os olfatórios também são alvo da indústria de alimentos. Estudos demonstram que o odor pode guiar a maneira como o gosto pode ser experimentado, sendo os odores muito agradáveis capazes de estimular a salivação e até mesmo aumentar a ingestão em indivíduos particularmente sensíveis ao alimento (GAILLET et al., 2013).

O estímulo dos aromas pode ser associado pelo epitélio olfatório através de duas vias: a via nasal (ortonasal) quando cheiramos algo proveniente do ambiente e a via oral (retronasal), durante o consumo de alimento (MURPHY; CAIN; BARTOSHUK, 1977). Quando o alimento entra na boca, o aroma da matriz alimentar durante a mastigação aumenta a percepção do sabor de um alimento (MURPHY; CAIN; BARTOSHUK, 1977). O aroma retronasal depende das características físicas do alimento, tais como forma e textura e o aroma ortonasal será o principal guia para associação e escolha do alimento (SEUVRE et al., 2004). O aroma, tomando em conjunto, está associado na regulação a curto prazo da alimentação, na detecção de alimentos e na direção da escolha (DE WIJK et al., 2012).

O sistema gustatório é um dos primeiros a passar a informação do alimento para o sistema nervoso central, ele está relacionado com a assimilação dos gostos dos alimentos (doce, salgado, amargo, azedo e umami) (BIRCH, 1999). Esses gostos estão associados à necessidade da procura por alimentos de qualidade. Em termos evolutivos, as preferências do paladar dos mamíferos são guiadas pela busca de alimentos ricos em energia, o que justifica o apelo sensorial pelo açúcar e pelas gorduras (SCOTT, 2004). Essa preferência prever no alimento uma qualidade sensorial segura (não tóxica) e um aporte energético alto (SCOTT, 2004). Além desse sistema, o paladar é influenciado por outras informações somato-sensoriais, tais como olfação e audição. Dessa forma, o sabor é considerado a marca sensorial do alimento determinada por sensores químicos diversos (TAYLOR, 1998).

Quando o alimento está na boca, seu sabor revela diversas informações sobre a qualidade do alimento e sua aceitabilidade (YEOMANS, 1996). O sabor de

um alimento tem relação direta sobre o apetite e a ingestão de alimentos. Dessa forma, se ao alimento for adicionado mais açúcar ou sal, aumenta a palatabilidade e por consequência a ingestão alimentar(YEOMANS, 1996). O nível ótimo de um sabor é modificável de acordo com cada indivíduo e sua experiência dietética, bem como sua prevalência no ambiente que está inserido(GRIFFIOEN-ROOSE et al., 2009). Dessa forma, a experiência com determinados alimentos pode flutuar para mais ou para menos, de acordo com um período de abundância ou depleção.

A habilidade para detectar o gosto de certos alimentos e determinados sais minerais é sentido através de células especializadas da língua chamadas papilas gustativas(ROPER, 2013). Cada célula dessa expressa um receptor dos cinco receptores de cada gosto. Substâncias saborosas como NaCl(salgado), ácido cítrico (azedo), sacarose(doce), quinino(amargo) e umami, ativam as fibras nervosas que enviam informações sobre o alimento para o sistema nervoso central(ROPER, 2013)

2.5 CONTROLE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO

A experiência multissensorial da palatabilidade é sentida e controlada por algumas regiões do sistema nervoso central(YEOMANS, 1998). Essa experiência vai ativar inicialmente a região encefálica relacionada com o órgão do sentido, o núcleo do trato solitário receberá aferências sobre informações gustativas(ROMAN; DERKACH; PALMITER, 2016), o córtex temporal processará informações sobre a experiência visual do alimento(CHELAZZI et al., 1993) e o tálamo sobre sua textura(BOURNE; BOURNE, 2002). Esses sinais são processados primordialmente no sistema cortico-mesolímbico(RUI, 2013).

A via mesolímbica que envolve diversas conexões nervosas tem como estruturas principais a área tegmentar ventral (VTA), o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal e é uma via chave para o controle da ingestão de alimentos palatáveis(WILLNER et al., 1991). A área tegmentar ventral está localizada no tronco encefálico e está associada como centro de processamento de informações sensoriais tanto na apresentação da comida, quanto na ingestão(FIELDS et al.,

2007). Essa região projeta principalmente informações de neurônios dopaminérgicos para o núcleo accumbens(BERRIDGE, 2009). A sinalização dopaminérgica no núcleo accumbens promove a busca pelo alimento (*Wanting*), modulando o início e a manutenção da refeição(BERRIDGE, 2009). O córtex pré-frontal está envolvido com as eferências que vão guiar a ação de ingestão(RUSHWORTH et al., 2004).

Outras estruturas estão envolvidas com essa via, entre elas podemos citar a Amígdala e o hipocampo que envolvem processos de memorização (*learning*) do alimento com fatores emocionais de prazer(BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009). A amígdala reforça o sentido afetivo de percepção do alimento palatável, enquanto o hipocampo forma a chamada memória de longa duração do estímulo de prazer do alimento(BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009).

Os neurônios dopaminérgicos envolvidos nessa via são estimulados pelo neurotransmissores glutamato e acetilcolina e são inibidos pelos neurônios GABA(VAN ZESSEN et al., 2012). Injeções de opioides no VTA aumenta a ingestão alimentar através da inibição de interneurônios GABA(NOEL; WISE, 1995). O sistema opioidérgico tem sido amplamente estudado como importante modulador do sistema de recompensa, atuando na via mesolímbica em seus dois principais segmentos (Accumbens-VTA, VTA- Córtex pré-frontal) modulando o impacto hedônico imediato (*Liking*)(LE MERRER et al., 2009).

2.6 OPIOIDES E COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O sistema opioidérgico e seus receptores desempenham um importante papel na modulação da ingestão alimentar, especialmente na mediação dos processos neurais de recompensa alimentar(FIELDS; MARGOLIS, 2015). Os opioides endógenos, que incluem endorfinas,encefalinas,dinorfinas e endomorfina, atuam sobre diferentes receptores, receptor opioidérgico μ (MOR), δ (DOR) e κ (KOR), que são membros da família de receptores acoplados a proteína G (BODNAR; KLEIN, 2004). Além desses receptores, podemos incluir o receptor para nociceptina/orfanina FQ(NOP), descoberto em 1994 através do seu sequenciamento

de oligonucleotídeos no qual possui 60% de homologia com os receptores opioidérgicos(CALO' et al., 2000).

A primeira evidência que o sistema opioidérgico poderia estar associado à regulação da alimentação foi com o estudo dos efeitos anorexígenos que a droga naloxona, antagonista geral de receptores opioidérgicos, causava na ingestão alimentar. (BROWN; HOLTZMAN, 1979). Estudos mais recentes demonstram que antagonistas opioidérgicos, como naloxona e naltrexona, diminuem a ingestão alimentar, enquanto os agonistas, como morfina e encefalinas sintéticas, aumentam a ingestão alimentar(FERENCZI et al., 2010; MASON et al., 2015; STATNICK et al., 2003). Além disso, os receptores opioidérgicos estão amplamente distribuídos em regiões cruciais do sistema nervoso central para o controle da ingestão alimentar e da homeostase energética(BODNAR; KLEIN, 2004).

A pró-opiomelanocortina (POMC) é um precursor polipeptídico que está associado com a produção de diversos hormônios peptídicos, entre eles o hormônio estimulador de α - melanócitos (α -MSH) que reduz a ingestão alimentar e a β -endorfina que influencia na ingestão alimentar e na regulação do humor (ANDERSON et al., 2016). A β -endorfina, expressa em células do núcleo arqueado do hipotálamo e no tronco cerebral, age no comportamento alimentar via MOR(BODNAR; KLEIN, 2004). Os neurônios POMC apresentam MOR pós-sinápticos e respondem a agonistas seletivos desse receptor com uma hiperpolarização, aumentando seu limiar de potencial de ação(PENNOCK; HENTGES, 2011). Além disso, uma ativação dos três principais receptores opioidérgicos, através de um agonista inespecífico, nos terminais GABAérgicos inibe os neurônios POMC pré-sinápticos(PENNOCK; HENTGES, 2011).

As melanocortinas produzidas pelos neurônios POMC atuam principalmente através de dois receptores na diminuição da ingestão alimentar: receptor de melanocortina 3 (MC3R) e o receptor de melanocortina 4(MC4R)(ANDERSON et al., 2016). O tratamento com naloxona diminui o efeito orexígeno do peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP), um importante peptídeo antagonista de MC3R e MC4R (HAGAN et al., 2001). A forte interação dos sistemas melanocortinérgicos e opioidérgicos é reforçada pela investigação do efeito do

tratamento com um antagonista seletivo de MOR que atua suprimindo o efeito orexigênico de um antagonista de MC3R e MC4R(GROSSMAN et al., 2003).

Outro importante peptídeo orexigênico que está intrinsecamente ligado aos opioides é o neuropeptídeo Y (NPY). Diversos estudos demonstram que a Naloxona atenua a ingestão alimentar estimulada pelo NPY(KOTZ et al., 1993; RUDSKI et al., 1996; SCHICK et al., 1991). A administração de antagonistas específicos de MOR e KOR diminuem o efeito orexigênico do NPY, enquanto antagonistas de DOR não mostram resultados efetivos(KOTZ et al., 1993). A orexina também é um importante mediador central do comportamento alimentar atuando como um neuropeptídeo orexigênico(SAKURAI et al., 1998). A administração de orexina no hipotálamo aumenta a expressão gênica de encefalina na área tegmentar ventral e na amígdala (KARATAYEV et al., 2009). Além disso, a naltrexona bloqueia a ação orexigênica da orexina A(SWEET; LEVINE; KOTZ, 2004). Esses dados tomados em conjunto sugerem que a orexina deve atuar no comportamento alimentar através das vias hedônicas e homeostáticas.

Dentre as várias ações que o sistema opioidérgico possui é sabido que ele desenvolve papel importante nos processos neurais de recompensa que levam a comportamentos adictos, tais como o abuso de álcool e drogas. A maioria dos componentes neurais que estão associados à adicção também está envolvida com a recompensa alimentar(FERENCZI et al., 2010; LE MERRER et al., 2009).

A administração de antagonistas de receptores opioidérgicos atenua tanto o uso de adictos quanto a preferência por alimentos palatáveis(FERENCZI et al., 2010). Agonistas opioidérgicos demonstram um aumento da ingestão de alimentos palatáveis, independentemente do valor calórico(PARKER et al., 2014). Esses resultados são acompanhados com o aumento da ingestão de alimento palatável no final de uma refeição regular, mostrando que os animais estão mais motivados para obter e ingerir esses alimentos.

Diversos estudos com o uso de drogas agonistas e antagonistas do sistema opioidérgico demonstram que os efeitos nas vias de recompensa são mais potentes que nas vias homeostáticas do comportamento alimentar(LEVINE et al., 1982; LYNCH; BURNS, 1990; ZHANG; KELLEY, 2002). Um estudo com

administração de Naloxona revelou uma supressão da ingestão de uma solução de sacarose mais eficiente do que a ingestão de água (LEVINE et al., 1982). Em contrapartida, a administração de DAMGO, agonista MOR, no núcleo accumbens aumenta a ingestão de sacarina, e na área tegmentar ventral provoca respostas alimentares em animais completamente saciados (MACDONALD; BILLINGTON; LEVINE, 2003; ZHANG; KELLEY, 2002). Alguns experimentos com infusões de opioides no núcleo accumbens revelam um aumento da ingestão de soluções de sacarose e da preferência por alimentos hiperlipídicos (PANDIT et al., 2011; ZHANG; KELLEY, 2002). Esses dados revelam que os Opioides aumentam a assimilação hedônica do sistema de recompensa, ou seja, o “Liking”.

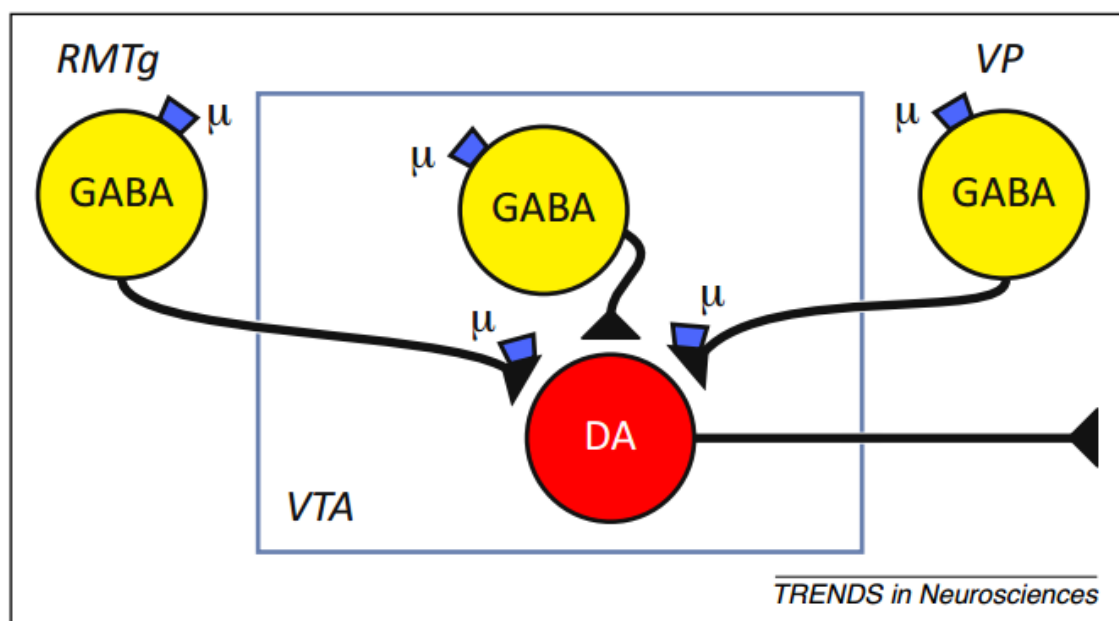
Os receptores μ -opioídeos têm sido vastamente estudados como os principais moduladores do sistema de recompensa através da percepção de estímulos sensoriais, tais como alimentos palatáveis e drogas de abuso (BERRIDGE, 2003; EVANS; VACCARINO, 1990; PECIÑA; BERRIDGE, 2000). Antagonistas MOR reverterem a preferência por soluções doces a água (LE MAGNEN et al., 1980). Em contrapartida, não modificam a ingestão calórica de alimentos palatáveis (APFELBAUM; MANDENOFF, 1981). Microinjeções de DAMGO (peptídeo opioide sintético com alta especificidade para o receptor μ opioide) no núcleo accumbens quadruplicam as reações positivas (“liking”) a ingestão de soluções de sacarose e atenua as reações aversivas a solução de Quinino (PECINA, 2005). Um estudo baseado na preferência alimentar de macronutrientes de animais de laboratórios demonstrou que alguns animais possuíam uma preferência por carboidratos à gordura (PECIÑA; BERRIDGE, 2000). A administração de morfina, agonista MOR, estimula a ingestão do seu alimento de preferência, enquanto a Naloxona exerce o efeito contrário (GOSNELL; KRAHN; MAJCHRZAK, 1990). Um outro estudo fez microinjeções de Naltrexona na amígdala e no núcleo paraventricular (PVN), enquanto na amígdala causou apenas uma diminuição dos alimentos de preferência, no PVN ambos os alimentos diminuíram (GLASS; BILLINGTON; LEVINE, 2000).

A área tegmentar ventral também é um local crítico para o mecanismo de recompensa da via MOR (KIEFFER, 1999). A preferência condicionada por um local (CPP) induzida pela administração sistêmica de agonista MOR pode ser bloqueada

pela infusão direta, na ATV, de antagonistas MOR(OLMSTEAD; FRANKLIN, 1997). Ademais microinjeções de antogonista do receptor μ -opioide na VTA aumenta a autoadministração de heroína(BRITT; WISE, 1983).

Complementando esses dados, diversos estudos mostram que a via de recompensa MOR é dada pela ativação de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo(KELLE; STINUS; IVERSEN, 1980; LACEY; MERCURI; NORTH, 1987; NICOLL; ALGER; JAHR, 1980). Um trabalho de Johnson e North demonstrou que a administração de agonistas MOR não ativou diretamente neurônios dopaminérgicos, e sim hiperpolarizou interneurônios GABAérgicos(JOHNSON; NORTH, 1992). Dessa forma, a ativação dos neurônios dopaminérgicos na VTA é feita de forma indireta pelo MOR, através da remoção da inibição tônica GABAérgica. Além disso, foi demonstrado que a desinibição dependente dos receptores de opioides dos neurônios dopaminérgicos pode ser mediada por múltiplas entradas de GABA, dentre as quais pode-se destacar o pálido ventral (VP), o núcleo tegmentar rostromedial (RMTg) e a área tegmentar ventral(VTA)(MATSUI et al., 2014).

Figura 2 - Representação esquemática dos locais onde os receptores μ -opioide podem desinibir



neurônios da área tegmental ventral

Fonte: Trends in Neurosciences.

3 HIPÓTESE

O tratamento neonatal com inibidor inespecífico opioidérgico atenua os efeitos do desmame precoce sobre a ingestão de alimentos palatáveis.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o bloqueio da via opioide neonatal é capaz de interferir sobre o comportamento alimentar hedônico de ratos desmamados precocemente.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em animais controle, submetidos a desmame precoce e ao desmame precoce com aplicação neonatal de Naltrexona:

- ✓ Peso corporal;
- ✓ A depressão experimental;
- ✓ O consumo de alimento palatável após um estresse agudo;
- ✓ O consumo de dieta padrão após jejum de 8 horas;
- ✓ A motivação pela busca da recompensa alimentar;
- ✓ A reatividade ao paladar frente à substância hedônica ou aversiva;
- ✓ O consumo de alimento palatável na vida adulta;
- ✓ O consumo de alimento palatável frente à dose aguda de inibidor inespecífico de receptores opioide;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA) da UFPE de acordo com os preceitos da lei editados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Segundo o processo 0052/2016 (vide apêndice 1). Foram utilizadas ratas albinas (200-250g de peso corporal) da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco(UFPE). As ratas 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 dietas padrão de biotério (Labina, Presence ®). Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes por mãe. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições padrão de biotério (temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18 horas), recebendo ração e água *ad libitum*.

5.2 DESMAME PRECOCE

O dia do nascimento da ninhada foi considerado dia zero. No primeiro dia pós-natal, foi realizada a sexagem dos animais com o objetivo de manter 8 filhotes machos em cada ninhada (as ninhadas que não obtiverem esse número poderão ser complementadas por fêmeas). Os grupos experimentais foram formados de acordo com o período do desmame de cada ninhada. As ninhadas pertencentes ao grupo D15 foram desmamadas no 15º dia pós-natal e o grupo D30 foram desmamadas no 30º dia pós-natal (desmame natural). As nutrizes dos animais D15 foram separadas de seus filhotes que foram submetidas a pequenos *peletes* de dieta padrão de biotério. A partir do 30º dia, todos os grupos foram submetidos a dieta padrão de biotério.

5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados de acordo com o dia do desmame e o tratamento neonatal:

- Grupo Desmame Precoce(D15) – animais desmamados no 15º dia pós-natal;
- Grupo Controle (D30) - animais desmamados no 30º dia pós-natal;
- Grupo Desmame Precoce + Naltrexona(D15+NTX): animais D15 submetidos à administração de naltrexona (3mg/Kg) por via subcutânea.

5.4 DROGA

Foi utilizado para o tratamento neonatal e para a avaliação pontual da ingestão alimentar o antagonista inespecífico de opioides (Naltrexona; $C_{20}H_{23}NO_4$, 341,401 g/mol) (Roval®, Recife, Brasil, lote 27042017) A droga foi dissolvida em solução salina estéril. Foi aplicado a dose de 3mg/Kg, por via subcutânea(MICHAELS; HOLTZMAN, 2007).

6 EXPERIMENTO 1: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DE ESTRESSE E DEPRESSÃO

6.1 PESO CORPORAL

Nos dias 1, 7, 14 e 21 e nos dias 30, 60, 90 e 120 de vida os animais (D15, n=8; D15 + NTX, n=8; D30, n=8) foram submetidos a avaliação do peso corporal. Foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (menor divisão 0,001g) (São Paulo, Brasil).

6.2 CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL APÓS UM ESTRESSE AGUDO

Aos 120 dias de vida os animais (D15, n=8; D15+ NTX, n=8; D30, n=8) foram submetidos a avaliação da média do consumo de alimento palatável (Cookies Chocolate Bauducco®, São Paulo, Brasil), durante três dias consecutivos, por uma hora, após estresse agudo. O estresse alimentar foi induzido através da introdução de dieta palatável em recipiente que não permitia a alimentação do animal. Dessa forma, o animal em jejum obteve apenas informações visuais e olfativas do alimento durante vinte minutos. O experimento ocorreu sempre no mesmo horário (estresse agudo entre 10: 40 e 11hs e o consumo entre 11hs e 12hs). Foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (menor divisão 0,001g) (São Paulo, Brasil).

6.3 CONSUMO ALIMENTAR EM RESPOSTA A PRIVAÇÃO ALIMENTAR DE 8HS

Aos 120 dias de vida os animais (D15, n=8; D15+ NTX, n=8; D30, n=8) foram submetidos a avaliação do consumo por 1 hora de alimento padrão de biotério (Purina®, São Paulo, Brasil), após oito horas de privação alimentar. O experimento ocorreu sempre no mesmo horário (privação das 7hs-15hs e consumo das 15hs-16hs). Foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (menor divisão 0,001g) (São Paulo, Brasil).

6.4 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

No teste de suspensão pela cauda o rato é colocado num estresse hemodinâmico de ser pendurado em uma situação inescapável e, assim, é observado quanto tempo passa numa postura imóvel desistindo de escapar de uma situação aversiva (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Aos 60 dias de vida os animais (D15, n=8; D15+ NTX, n=8; D30; n=8) foram submetidos a esse teste que consistiu em suspender o animal pela cauda num aparato metálico fixado na parede a uma distância de 1,5 m do chão. A fixação desse animal foi realizada por uma pequena faixa elástica que ligará a cauda do animal ao aparato. Para evitar lesões cutâneas, 2 minutos antes do teste, a porção distal da cauda do animal foi revestida por uma espuma adesiva (Reston ®, São Paulo, Brasil). Cada animal permaneceu suspenso por 6 minutos e os seguintes padrões foram cronometrados: imobilidade flexionada e movimentação difusa.

7 EXPERIMENTO 2: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DO SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR

7.1 TESTE DO CORREDOR (RUNWAY TASK INCENTIVE)

Aos 60 dias de vida , os animais(D15, n=8; D15+ NTX, n=8; D30, n=8) foram submetidos ao teste do corredor para avaliar os padrões de “Learning” e “Wanting” (PECINA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2010; DA SILVA et. al.,2016) após um período de 4 horas de privação alimentar. A estrutura do runway consisti em um corredor (polipropileno, 140×14×30cm) com duas caixas, uma inicial e outra alvo (acrílico 19×14×30 cm), localizadas em extremidades opostas. Os treinos serão foram conduzidos durante 11 sessões em dias alternados (22 dias), cada sessão teve duração de 5min. Nas três primeiras sessões os ratos foram colocados diretamente na caixa alvo (com as portas fechadas) durante 5 minutos com acesso a recompensa (cookies chocolate Bauducco[®], São Paulo, Brasil). Os animais foram adaptados aos cookies chocolate (Bauducco[®], São Paulo, Brasil) nas 3 primeiras sessões. Na 4^a sessão do treino, a caixa inicial foi localizada 15 cm da caixa alvo. O animal ficou na caixa inicial durante 30 segundos com a porta fechada, então a porta se elevou e o animal prosseguiu pelo centro de corrida. Se o animal não saísse da caixa inicial em 3 minutos, ele seria gentilmente movido para a caixa alvo. Na sessão 5 a caixa inicial se afastou 30cm da caixa alvo, para 60 cm na 6^a sessão, 75cm na 7^a, 90cm na 8^a, 120cm na 9^a e 140cm da 10-11 sessões. Foram avaliados o tempo de latência para sair da caixa inicial, tempo de latência para reagir ao caixa alvo, número de pausas durante a corrida, número de direção reversa no trajeto da corrida até o alvo (incluindo retração dos passos, acompanhado do comportamento exploratório de cheirar); Tempo de latência para iniciar o consumo da recompensa.

7.2 TESTE DE REATIVIDADE AO PALADAR

O teste de reatividade ao paladar (GRILL; NORGREN, 1978; DA SILVA et. al.,2016) foi realizado para estudar o “Liking” a partir da avaliação do tempo de reação frente a diferentes substâncias (BERRIDGE, 2000).Este teste foi realizado

aos 90 dias de vida dos animais (D15, n=8; D15+ NTX, n=8; D30, n=8) que foram colocados individualmente numa arena (25cm altura x 25cm frente x 20cm fundo), com um piso e paredes transparentes. Foi disposto 1mL de solução de sacarose à 30% ou solução de quinino ($C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl \cdot 2H_2O$, Sigma®) à 0,3 M, no canto esquerdo da arena e diretamente no piso. Uma câmera de vídeo (Sony Handycam DCR-DVD650, com função nightshot, Tóquio, Japão) foi posicionada sob o piso transparente para filmar as reações faciais e corporais espontâneas que ocorreram durante e após a ingestão voluntária de sacarose ou quinino. Os animais foram habituados para a arena do teste durante 2,5 min antes do teste. Em cada teste, as soluções de sacarose ou de quinino foram colocadas no interior da arena, e os animais foram liberados para ingerir as soluções por 2,5 minutos, durante o qual comportamento foi filmado para posterior análise. Para determinar as reações afetivas dos animais foram consideradas como reações positivas ou hedônicas: protrusões rítmicas da língua, protrusão lateral da língua e lambear as patas. E como reações negativas ou aversivas: bocejo, remexer a cabeça, limpar o rosto, “abandar” com as patas anteriores, esfregar o queixo. As análises entre um tipo de solução e outra foram realizadas com intervalo mínimo de 48h.

7.3 CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL

Aos 120 dias de vida os animais (D15, n=8; D15+ NTX, n=8; D30; n=8) foram submetidos a avaliação da média do consumo de alimento palatável (Cookies Chocolate Bauducco®, São Paulo, Brasil), durante três dias consecutivos, por uma hora. Ocorreu sempre no mesmo horário, estabelecido entre 11h00min e 12h00min. Foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (menor divisão 0,001g).

O consumo de alimento palatável frente à dose aguda de inibidor inespecífico de receptores opioidérgicos

Aos 120 dias de vida os animais (D15, n=8; D15+ NTX, n=8; D30, n=8) foram submetidos a avaliação do consumo de alimento palatável (Cookies Chocolate Bauducco®, cidade e país da empresa), por uma hora, após dose aguda de solução

salina (3mg/kg) e, uma semana depois, o mesmo processo foi repetido com aplicação aguda de Naltrexona(3mg/kg). O experimento ocorreu sempre no mesmo horário (aplicação as 10:30min e o consumo entre 11hs e 12hs). Foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (menor divisão 0,001g).

7.4 ANALISES ESTATÍSTICAS

Dados são apresentados como média e desvio padrão. Para avaliação do peso corporal, teste do corredor (runway task incentive) e consumo de alimento palatável frente a dose aguda de naltrexona foi utilizado two way ANOVA seguido de Bonferroni Test. Para consumo de alimento palatável, consumo de alimento palatável após estresse agudo, após privação alimentar de 8 horas, teste de suspensão pela cauda e teste de reatividade ao paladar foi utilizado o one way ANOVA seguido de Bonferroni Test. Em todas as avaliações, o nível de significância foi $p \leq 0,05$. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 5, versão 7 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

8 RESULTADOS

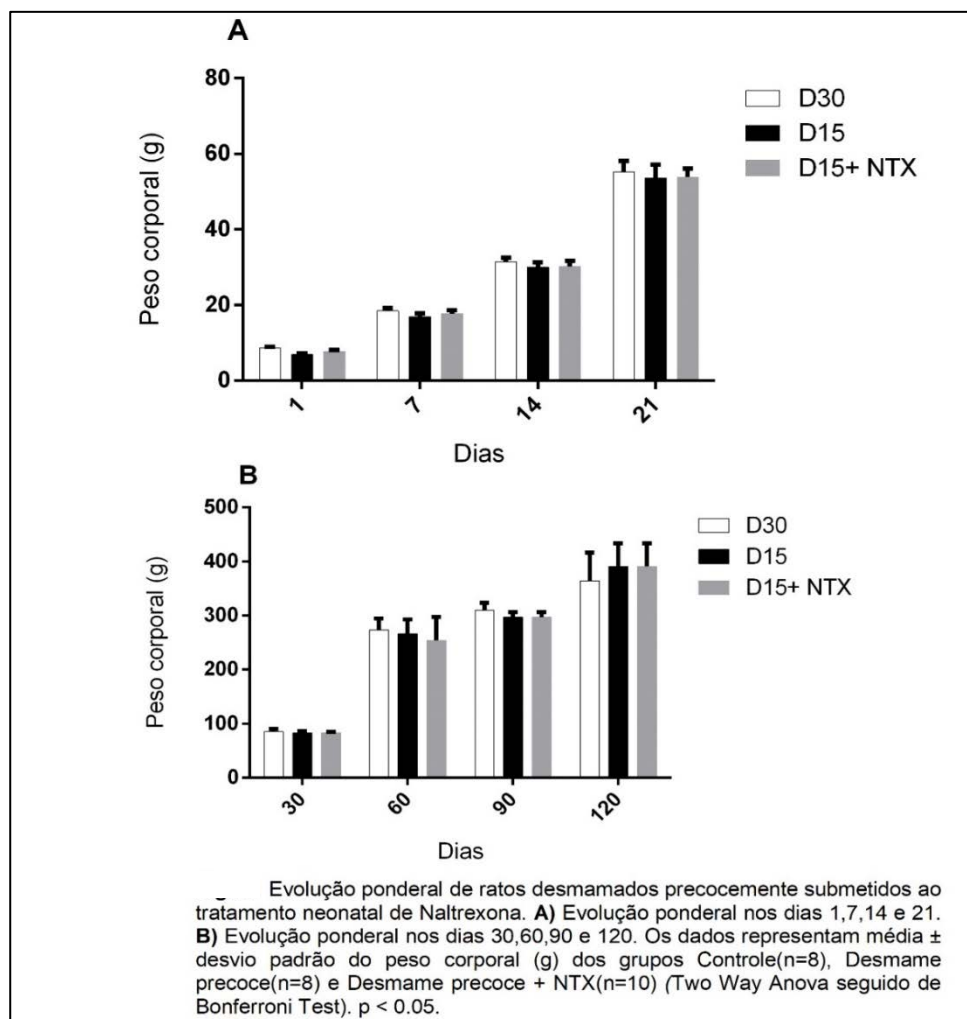
8.1 EXPERIMENTO 1: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DE ESTRESSE E DEPRESSÃO

8.1.1 Peso corporal

Não houve diferenças significativas entres os grupos avaliados (figura 3 A

Figura 3 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre a evolução ponderal em ratos que foram desmamados precocemente.

e B).

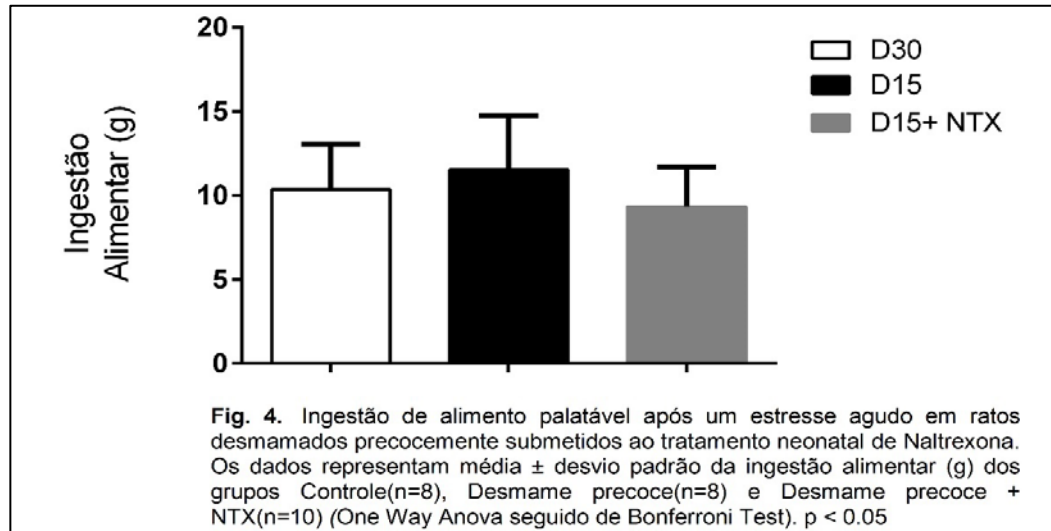


Fonte: Elaborada pela autora

8.1.2 Consumo de alimento palatável após estresse agudo

Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (figura 4).

Figura 4 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre o consumo alimentar de dieta



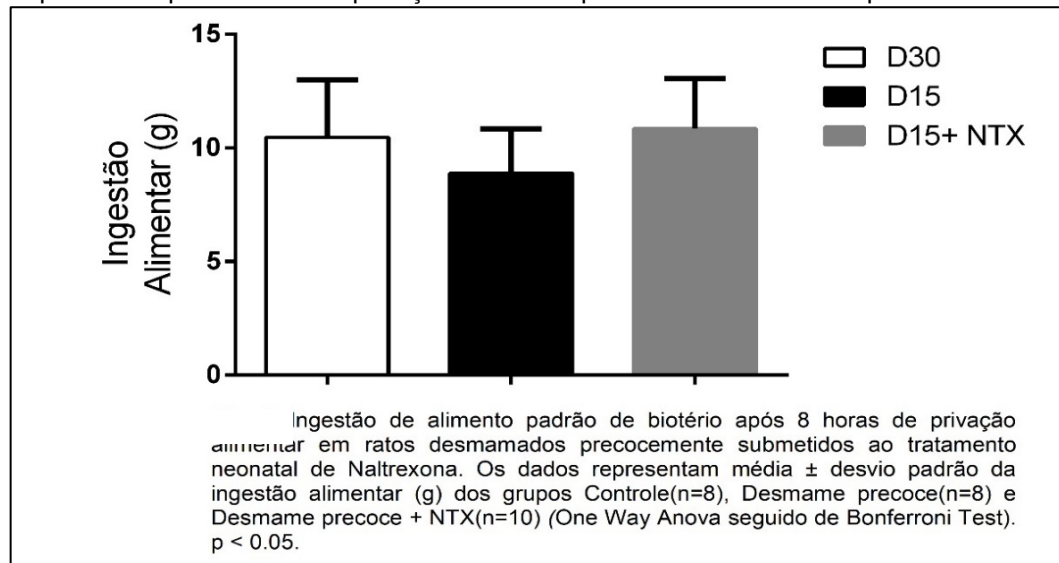
palatável após estresse alimentar agudo em ratos que foram desmamados precocemente.

Fonte: Elaborada pela autora

8.1.3 Consumo alimentar após 8 horas de privação

Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (figura 5).

Figura 5 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre o consumo alimentar de dieta palatável após 8 horas de privação em ratos que foram desmamados precocemente

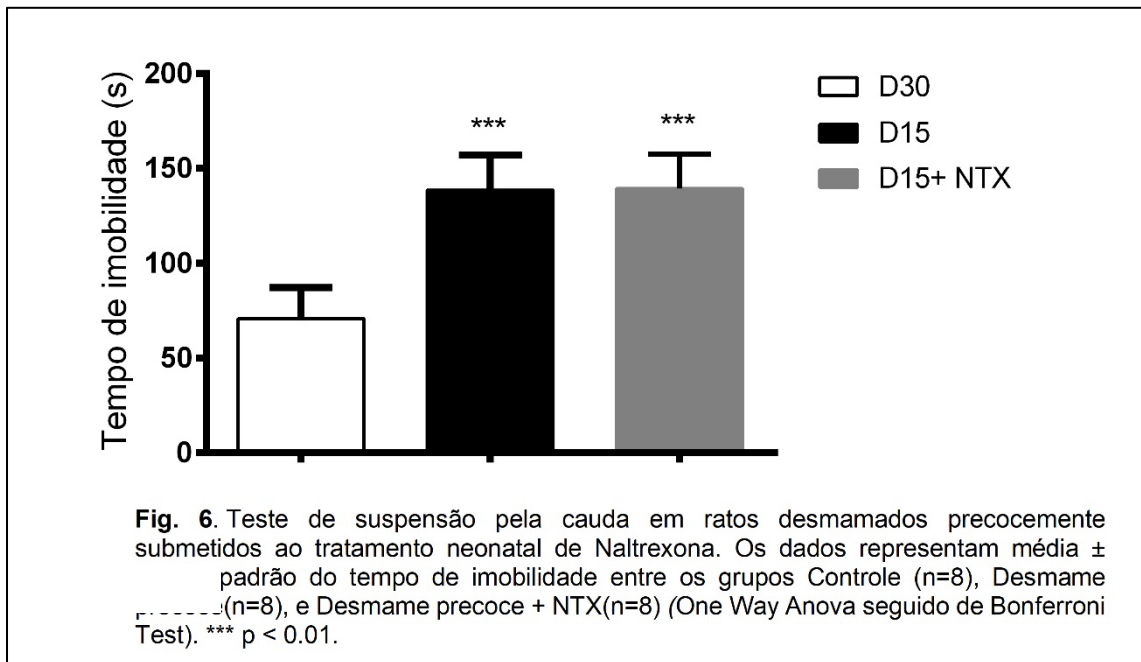


Fonte: Elaborada pela autora.

8.1.4 Teste de suspensão pela cauda

Os grupos D15 (n=8; 138,3 $\pm$ 18,6; $p < 0,01$) e D15 + NTX (n=8; 139,3 $\pm$ 18; $p < 0,01$) apresentaram um aumento do tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle(n=8; 70,6 $\pm$ 16,5; $p < 0,01$), mas não houve alterações significativas quando comparados entre si (figura 06).

Figura 6 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre comportamento semelhante a depressão em ratos que foram desmamados precocemente.



Fonte: Elaborada pela autora

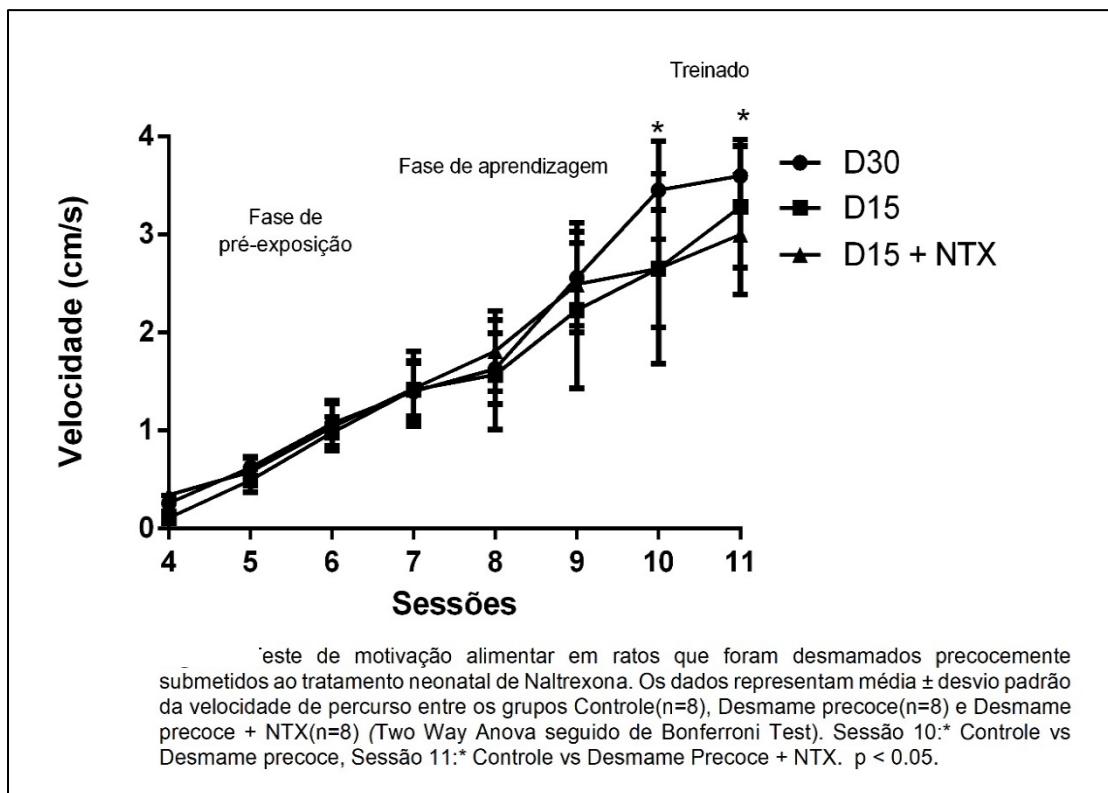
8.2 EXPERIMENTO 2: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DO SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR

8.2.1 Teste do corredor (Runway Task incentive)

O grupo D15 (n=8; $2,65 \pm 0,97$; $p < 0,05$) apresenta uma menor velocidade em busca da recompensa apenas na sessão 10 quando comparado ao grupo controle (n=8; $3,45 \pm 0,5$; $p < 0,05$) e não apresenta alteração significativa quando comparado ao grupo D15+ NTX (n=8; $2,98 \pm 0,60$; $p < 0,05$). Já na sessão 11 apenas o grupo D15 + NTX (n=8; $3 \pm 0,61$; $p < 0,05$) apresentará menor velocidade quando comparados ao grupo controle (n=8; $3,6 \pm 0,37$; $p < 0,05$) (Figura 07).

Figura 7 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre teste de motivação alimentar em ratos que foram desmamados precocemente.

Font

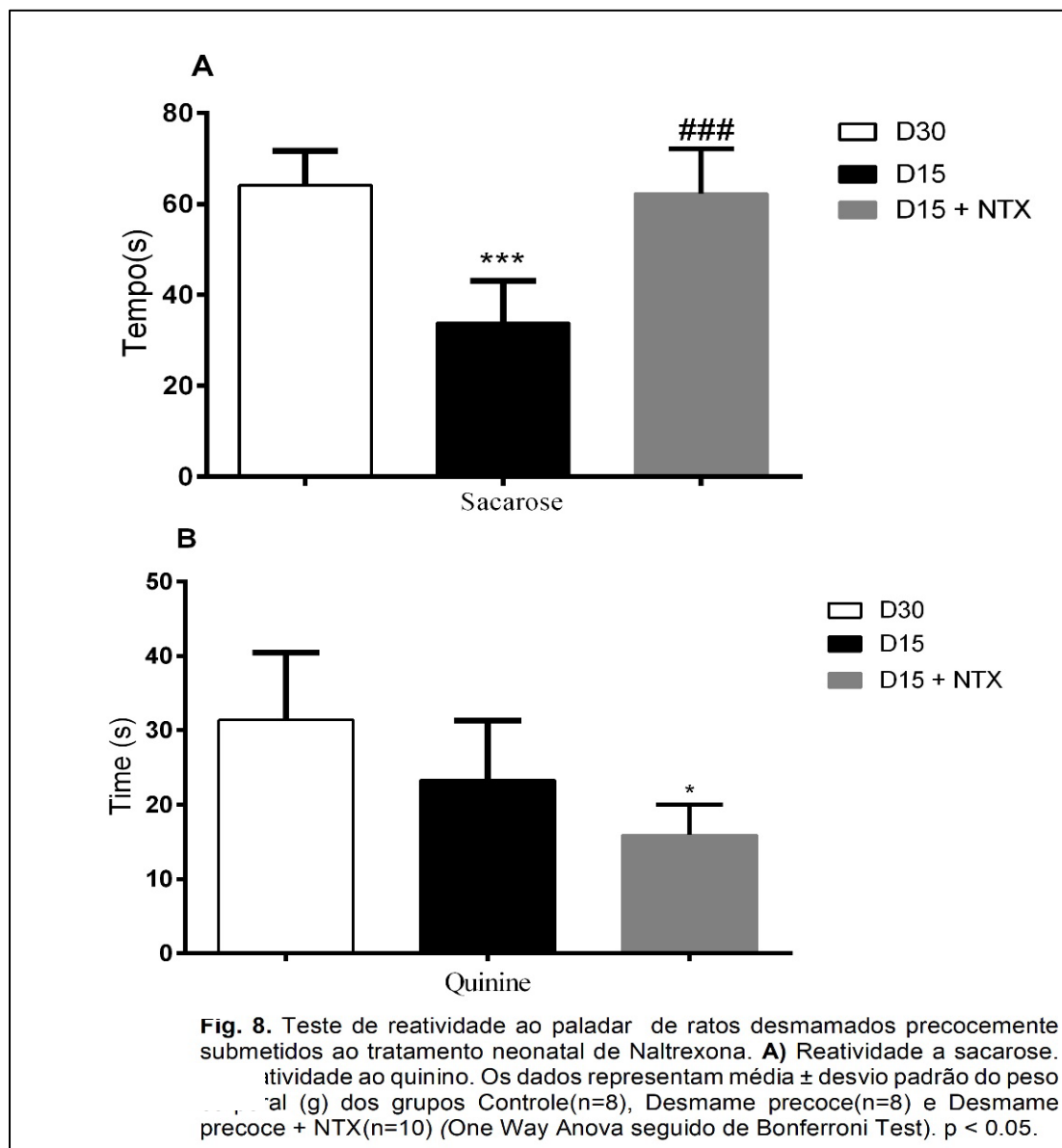


e: Elaborada pela autora

8.2.2 Teste de reatividade ao paladar

No tempo de reatividade a sacarose o grupo D15 (n=8; $33,8 \pm 9,3$; $p < 0,05$) apresentou um menor tempo de reação quando comparado ao grupo D30 (n=8; $64,1 \pm 8$; $p < 0,05$). O grupo D15 + NTX (n=8; $62,3 \pm 9,8$; $p < 0,05$) apresentou um aumento da reação a sacarose quando comparado ao grupo D15 (n=8; $33,8 \pm 9,3$; $p < 0,05$) (Figura 8A). No tempo de reação ao quinino houve uma diminuição do tempo de reação do Grupo D15+NTX (n=8; $15,9 \pm 4,16$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo D30 (n=8; $31,4 \pm 9,1$; $p < 0,05$) (Figura B). .

Figura 8 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre teste de Reatividade ao paladar em ratos que foram desmamados precocemente.

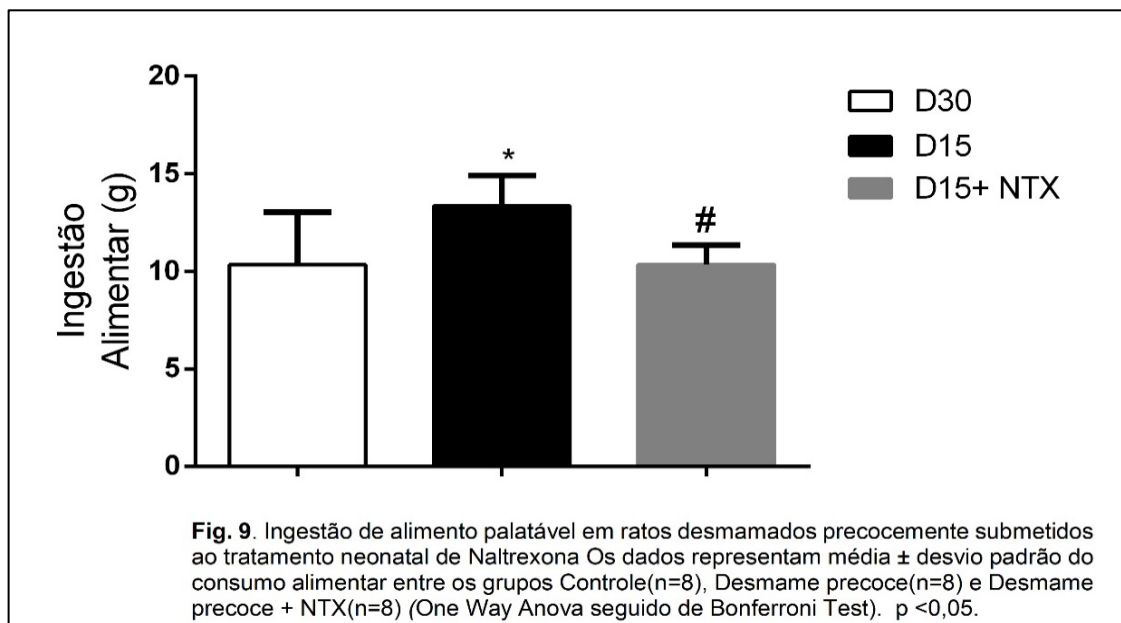


Fonte: Elaborada pela autora

8.2.3 Consumo de alimento palatável

A ingestão alimentar absoluta do grupo D15(n=8; $13,36 \pm 1,56$; $p < 0,05$) foi maior que o grupo D30 (n=8; $10,34 \pm 2,70$; $p < 0,05$). O grupo D15 + NTX (n=8; $10,35 \pm 1$; $p < 0,05$) quando comparado com o D15 apresenta uma diminuição da ingestão alimentar (figura 09).

Figura 9 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre a ingestão alimentar palatável em



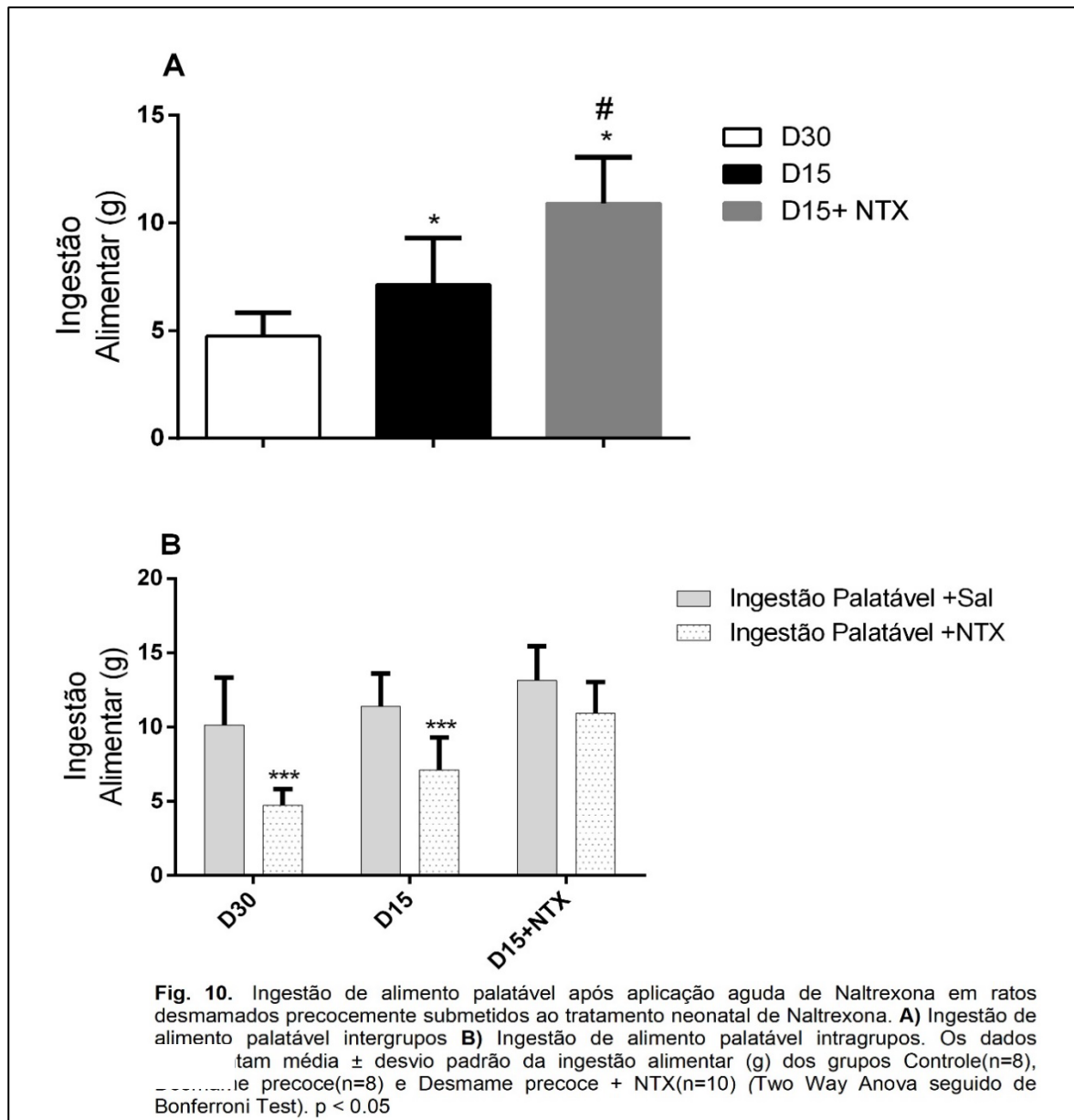
Fonte: Elaborada pela autora

ratos que foram desmamados precocemente.

8.2.4 Consumo de alimento palatável após aplicação aguda de Naltrexona

No consumo alimentar palatável intergrupos, o grupo D15 (n=8; $7,13 \pm 2,18$; $p < 0,05$) apresentou um aumento do consumo alimentar em comparação ao grupo D30 (n=8; $4,74 \pm 1,09$; $p < 0,05$). Já o grupo D15+ NTX (n=8; $10,92 \pm 2,12$; $p < 0,05$) apresentou um aumento do consumo quando comparado ao grupo D15 e ao grupo D30 (figura 10 A). No consumo alimentar intragrupos, o grupo D30 com aplicação de naltrexona aguda (n=8; $4,74 \pm 1,09$; $p < 0,001$) apresentou uma diminuição do consumo alimentar quando comparado ao grupo D30 com aplicação aguda de solução de salina (n=8; $10,15 \pm 3,18$; $p < 0,05$). O grupo D15 submetido a dose aguda de naltrexona (n=8; $7,13 \pm 2,18$; $p < 0,001$) também apresentou uma diminuição do consumo alimentar quando comparado ao grupo com aplicação de salina (n=8; $11,41 \pm 2,10$; $p < 0,05$). Já o grupo D15+ NTX demonstrou-se resistente a aplicação aguda de naltrexona (n=8; $13,15 \pm 2,30$; $p < 0,05$) e não houve diferenças quando comparado a aplicação de salina (n=8; $10,92 \pm 2,12$; $p < 0,05$) (figura 10B).

Figura 10 - Efeito do tratamento neonatal com Naltrexona sobre o consumo alimentar de dieta palatável após aplicação aguda de Naltrexona em ratos que foram desmamados precocemente.



Fonte: Elaborada pela autora

9 DISCUSSÃO

9.1 EXPERIMENTO 1: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DE ESTRESSE E DEPRESSÃO

Os ratos submetidos a desmame precoce não apresentaram diferença no consumo de alimento palatável após uma restrição de acesso de curta duração e nem no consumo de dieta padrão após oito horas de privação alimentar. Nas datas avaliadas não houve alteração do peso corporal. No teste de suspensão pela cauda os ratos desmamados precocemente apresentam maior comportamento associado a padrões depressivos, o tratamento com naltrexona neonatal não reverteu esse perfil.

O peso corporal não apresentou alteração entre os grupos, esses dados estão de acordo com o estudo de OLIVEIRA e colaboradores, em 2011, que utilizou o mesmo modelo de desmame precoce utilizado nesse estudo e observou uma diminuição no peso apenas imediatamente após a separação materna.

Os animais submetidos ao desmame precoce demonstram não alterar seu padrão de reação quando submetidos aos dois tipos de estresse agudo, o estresse que avaliou a ingestão alimentar hedônica e o estresse que avaliou a ingestão alimentar de dieta padrão. No teste que avaliou a ingestão de alimento palatável o animal perdeu a capacidade de acessar o alimento por um curto período, porém, teve acesso a informações visuais e olfativas. Esse teste avalia o consumo alimentar, sem jejum prévio, após um período de restrição com o objetivo de quantificar a ingestão alimentar palatável apenas em resposta ao estresse alimentar. Já o teste de ingestão de alimento padrão de biotério foi quantificado a partir de um estresse moderado promovido pelo jejum prolongado. O estresse é definido como uma ameaça contínua ou antecipada a homeostase ou ao bem-estar, e evoca uma gama de respostas fisiológicas e comportamentais (BALI; JAGGI, 2015). Os resultados encontrados nesse trabalho podem estar associados ao padrão de resposta do organismo ao estresse agudo.

Alguns trabalhos já demonstram que o efeito do desmame precoce nas alterações comportamentais frente a situações estressantes. A separação materna

neonatal é um estressor intenso que induz a hiperatividade a longo prazo do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)(LADD et al., 2000; PLOTSKY; MEANEY, 1993). Isso é caracterizado na idade adulta por níveis aumentados de glicocorticoides circulantes em repouso e pela redução de receptores de glicocorticoides (GR) no hipocampo (diminuindo o feedback negativo dos glicocorticoides)(LIU et al., 1997). Apesar desses dados, os efeitos da exposição ao estresse e a ingestão de alimentos depende de vários fatores, entre eles, o tipo do estresse e se é um estressor agudo ou crônico(SOMINSKY; SPENCER, 2014). Num estresse agudo há uma supressão da ingestão de alimentos que é mediada pelo hormônio liberador de corticotrofina(CRH) que atua inibindo os peptídeos orexigênicos NPY (neuropeptídeo Y) e AGRP (proteína relacionada ao agouti), no núcleo arqueado(CURRIE, 2003; HEINRICHS et al., 1993). Esse recurso é utilizado pelo organismo para priorizar reações de luta e fuga(SOMINSKY; SPENCER, 2014). O que pode sugerir que os dados de ingestão alimentar, a curto prazo, demonstrados nesse trabalho podem usar desse recurso para mascarar efeitos deletérios nas vias neuroendócrinas responsáveis por respostas comportamentais a fatores estressores e precisem de um teste comportamental que esteja relacionado a luta e fuga para demonstrar alterações. Um estudo com roedores demonstrou que o efeito do estresse alimentar alterou potencialmente a agressividade dos animais precocemente desmamados quando associados a um estresse social(NAKAMURA et al., 2008). Esses animais apresentam taxas menores de agressividade quando comparados aos naturalmente desmamados no teste de exposição ao intruso(NAKAMURA et al., 2008). Porém quando são submetidos a uma restrição alimentar aguda prévia, o padrão inverte e ratos submetidos ao desmame precoce tendem a ser mais agressivos(NAKAMURA et al., 2008). Esses resultados sugerem que o tempo de desmame modula o comportamento social quando associado a um estresse alimentar.

Outros estudos com desmame precoce demonstram que estresses a curto prazo tendem alterar padrões bioquímicos após eventos estressores pontuais. Camundongos adultos desmamados precocemente apresentam um maior nível de corticosterona aos 45 minutos, mas não aos 20 minutos, após o teste de labirinto elevado em cruz(KIKUSUI et al., 2006). Sugerindo que os ratos tenham menor feedback negativo em resposta a corticosterona circulante. Outro estudo com ratos que sofreram privações maternas aumentam a resposta a corticosterona a

estimulação acústica aos 60 minutos após o estresse, mas não aos 30 minutos(PARFITT et al., 2004). Nesse estudo não foi quantificado a corticosterona após as medidas de ingestão alimentar e dessa forma sugerimos que a corticosterona dos animais desmamados precocemente pode estar alterada para atingir um comportamento semelhante a animais desmamados naturalmente frente a estresse agudo. Além disso animais que passam por ciclos de jejum e realimentação, tendem a demonstrar efeitos hiperfágicos mais tardiamente, a chamada hiperfagia de rebote que pode ocorrer dias depois do jejum(INOUE et al., 1998). Ratos que foram submetidos a separação materna durante a lactação tendem a apresentar um aumento dessa hiperfagia de rebote(IWASAKI et al., 2000). Dessa forma, podemos sugerir que os efeitos do estresse agudo pelo jejum prolongado podem ter ocorrido apenas dias depois da análise comportamental.

Outro ponto importante a ser analisado em futuras publicações é avaliar testes comportamentais em animais desmamados precocemente submetidos a estresse alimentar crônico. O estresse agudo desencadeia duas principais cascatas de eventos biológicos a ativação do eixo HPA e ativação do eixo simpático adrenomedular para mecanismos de luta e fuga(TSIGOS; CHROUSOS, 2002). Porém, a exposição repetida ao estressor, padrão crônico, é associado a uma maior sensibilização do eixo HPA para lidar com as demandas persistentes do desafio homeostático(HERMAN, 2013). Para lidar com essa demanda o organismo tende a aumentar o aporte energético, dessa forma muda a estratégia do comportamento alimentar(BJÖRNTORP, 2001). Assim, o estresse crônico altera a seleção de alimentos para uma maior proporção de calorias provenientes de alimentos palatáveis(GROESZ et al., 2012). Essa seleção alterada de alimentos é muitas vezes referida como “*comfort food*” que seria a ingestão saborosa de alimentos como redutor de respostas ao estresse(WELTENS; ZHAO; VAN OUDENHOVE, 2014). Ou seja, seria uma estratégia do organismo para se auto-medicar em situações estressoras(WELTENS; ZHAO; VAN OUDENHOVE, 2014). Além disso, a ingestão de alimentos palatáveis é mais alterada que dietas padrão, geralmente aumentando sua proporção nas refeições(LA FLEUR et al., 2014). A dieta usada nesse trabalho é considerada palatável, rica em lipídios e carboidratos. Se o estresse for aplicado de maneira crônica, talvez os mecanismos modificados pelo

desmame precoce no comportamento alimentar sobreponha aos mecanismos de redução da ingestão e haja diferenças significativas entre os grupos.

Indivíduos que possuem padrões comportamentais associados a depressão mostram maior preferência e consumo de “*comfort food*” como uma forma de aliviar sentimentos adversos (MACHT, 2008). No teste de suspensão pela cauda (TST) realizado nesse estudo, os ratos que foram desmamados precocemente apresentaram elevado tempo de imobilidade indicando maior padrão de comportamento semelhante a depressão. No TST o rato é colocado num estresse hemodinâmico de ser pendurado em uma situação inescapável e, assim, é observado quanto tempo passa numa postura imóvel desistindo de escapar de uma situação aversiva (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Esses dados são corroborados com a literatura, tanto em humanos quanto em animais de laboratório, que associam a depressão com eventos estressores na infância (CHAN; DOAN; TOMPSON, 2014; VETULANI, 2013). Em humanos, 60% dos casos de depressão são precedidos por exposição a estressores, especialmente os de vínculos maternos, como a privação materna prolongada (JURUENA, 2011). Como foi supracitado, o desmame precoce causa alterações no eixo HPA, aumentando os níveis de glicocorticoides circulantes (LIU, 1997). Essa alteração também ocorre na depressão, achados demonstram que há disfunções de estruturas límbicas, sobretudo o hipotálamo e o hipocampo, que apresentam um aumento da secreção de CRH e uma resistência a GR (causando um aumento da corticosterona circulante) (VON WERNE BAES et al., 2012). Dessa forma, podemos sugerir que o desmame precoce desempenha um papel crítico no eixo HPA que pode resultar em uma ampla gama de alterações comportamentais, entre elas a predisposição a depressão.

Outro achado muito importante sobre o desmame precoce e comportamento semelhante a depressão em animais de laboratório é o papel do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é relevante para a plasticidade em quase todos os aspectos de desenvolvimento fetal (também durante a vida adulta) (CHAO, 2003). Na hipótese da neurotrofina há uma associação entre a diminuição da expressão de BDNF e atrofia de estruturas límbicas com a depressão, assim como um aumento plasmático dessa neurotrofina com o efeito

antidepressivo(PICCINNI et al., 2008; TALIAZ et al., 2010). Tanto o BDNF quanto a neurogênese são relatados como diminuídos em níveis altos de glicocorticoides(LIU et al., 2000; MIRESCU; PETERS; GOULD, 2004). Animais com privação materna inibem a neurogênese adulta e os níveis de BDNF e essas alterações neuroquímicas estão associadas com os sintomas psicopatológicos da depressão(TSANKOVA et al., 2006). Em animais que foram submetidos a desmame precoce foi encontrado menores taxas de BDNF na 3ª, 5ª e 8ª semana de vida pós-natal no giro denteado(KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). Além disso, a neurogênese foi menor em animais desmamados precocemente, logo após o desmame(KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que o desmame precoce diminui a neurogênese e a expressão de BDNF provavelmente pela ação dos glicocorticoides causando um aumento da predisposição a depressão que foi encontrada nesse trabalho. Os animais que foram tratados com naltrexona no período de lactação não reverteu o perfil no teste de suspensão pela cauda. A naltrexona bloqueia os receptores opioidérgicos, portanto existe uma base farmacológica como potencial efeito depressor justificando sua ação nos resultados desse trabalho ligado ao teste de suspensão pela cauda(RITTER, 2002).

Em conclusão, esse trabalho demonstrou que os animais submetidos ao desmame precoce apresentam padrão de comportamento semelhante a depressão significativamente aumentados. Além disso, dados pontuais de estresse alimentar agudo não demonstram alterações significativas, porém, serão necessários mais estudos para destrinchar seus padrões de resposta quando o tipo de estresse e a duração forem alterados.

9.2 EXPERIMENTO 2: DESMAME PRECOCE E PADRÕES COMPORTAMENTAIS DO SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR

O desmame precoce não alterou persistentemente a velocidade pela busca do alimento palatável, em ambos os grupos experimentais. Enquanto na análise da reatividade ao paladar frente a solução de sacarose e de quinino houve diferenças. O grupo desmame precoce apresenta uma diminuição do tempo de

reação a solução de sacarose e o grupo desmame precoce tratado com naltrexona apresenta um aumento da reação. Já na solução de quinino, apenas o grupo tratado apresenta um aumento no tempo de reação a substância aversiva. A ingestão de alimento palatável foi aumentada no grupo desmame precoce, e o tratamento crônico com naltrexona reverteu esse aumento. Com relação a ingestão alimentar após dose aguda de naltrexona, o grupo desmame precoce apresentou uma redução e o grupo desmame precoce tratado com naltrexona demonstrou ser resistente ao efeito agudo da naltrexona.

O sistema de recompensa alimentar está associado aos eventos psicológicos e neurobiológicos que produzem a sensação consciente e inconsciente de prazer no indivíduo(SALAMONE; CORREA, 2012). Quando essa via é ativada aumenta a probabilidade futura de uma resposta comportamental que produza um resultado benéfico(prazer), ou seja um reforço positivo(SALAMONE; CORREA, 2012). A literatura descreve três componentes distintos de recompensa : “Liking”, que é o impacto hedônico da experiencia, “Wanting”, um tipo de motivação de incentivo que promove a abordagem e o consumo de recompensas, e o “Learning” que faz previsões e associações a eventos benéficos passados(BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009)

O runway task incentive é um teste experimental que avalia os componentes “wanting” e “learning” após privação alimentar(SILVEIRA et al., 2010). Nas sessões que representam as curvas de incentivo ao aprendizado (7-9) não houve diferença na velocidade dos animais que foram submetidos ao desmame precoce. Na sessão 10, fase em que os animais já estão treinados, o grupo desmame precoce apresentou uma diminuição pontual da velocidade que não foi mantida na sessão 11. Já o grupo desmame precoce tratado com naltrexona não apresentou alteração na sessão 10, e apresentou uma diminuição da velocidade pontual na sessão 11. Já o teste de reatividade ao paladar é um teste que vai avaliar o “liking” dos animais frente a substância com incentivo hedônico (solução de sacarose) ou aversivo (solução de quinino)(GRILL; NORGREN, 1978). Os ratos que foram submetidos ao desmame precoce apresentam uma diminuição das reações tidas como reações de prazer e um aumento da ingestão de alimento palatável. Esse perfil demonstra-se revertido após um tratamento crônico com naltrexona.

A reatividade ao paladar exerce um papel importante na orientação do comportamento ingestivos (BERRIDGE, 2000). A resposta hedônica dos sabores básicos é sujeita a uma “programação” fetal e/ou perinatal (AYRES et al., 2012; TRUXELL; MOLINA; SPEAR, 2007). Nos ratos desmamados precocemente foi encontrada uma menor pontuação de “liking”. Esse mesmo padrão é encontrado em modelos experimentais de obesidade e sobrepeso cujas reações de prazer diminuídas são compensadas no aumento do consumo alimentar energético para atingir padrões de recompensa alimentar (BELLISLE et al., 2012). Esses dados corroboram com diversos estudos que demonstram que indivíduos que são submetidos a injúrias alimentares e/ou o déficit da proteção social e da maturação do sistema sensorial ofertada pela mãe apresentam maior tendência de ingerir alimentos palatáveis na vida adulta (DA SILVA et al., 2014; DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; ROCHA et al., 2014). Isso ocorre, pois, o indivíduo matura seus padrões de comportamento alimentar para que possa armazenar o máximo de energia possível para um ambiente pobre em nutrientes.

O aumento da ingestão alimentar palatável é corroborado com alguns dados já publicados do nosso grupo de pesquisa. Esses dados demonstram que animais desmamados precocemente apresenta uma preferência por dietas hipercalóricas e um aumento da ingestão de alimentos palatáveis, além disso apresentam um retardo no ponto de saciedade (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Outros estudos com desmame precoce associam a desnutrição neonatal submetida apenas pela ausência do leite materno como fator indutor de alterações metabólicas que demonstram padrões orexigênicos associadas a síndrome metabólica na vida adulta (DA SILVA LIMA et al., 2011; PEIXOTO-SILVA et al., 2017; YOUNES-RAPOZO et al., 2015). Em um experimento com produção de leite suprimida, por um inibidor da prolactina, foi demonstrado na vida adulta um aumento da densidade de fibras do neuropeptídeo Y (NPY), importante peptídeo orexigênico, nos núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo. (YOUNES-RAPOZO et al., 2015). Outro estudo avaliou animais que não tiveram acesso ao leite materno, do dia 18 ao 21 pós-natal, através de uma barreira mecânica imposta por um bandagem nas glândulas mamárias (DA SILVA LIMA et al., 2011). Esses animais apresentaram na vida adulta maior adiposidade, resistência à

insulina e dislipidemia, padrões relacionados ao desenvolvimento da obesidade (DA SILVA LIMA et al., 2011).

Além do rompimento precoce da ingestão do leite materno, é importante ressaltar que nosso modelo experimental de desmame precoce causa também uma quebra do *link* mãe-filho no 15º dia de vida pós-natal. O cérebro dos filhotes de mamíferos decide sobre a organização fisiológica dos seus aspectos sensoriais mais adequados para o ambiente que está sendo desenvolvido, e atua como um sistema de tomada de decisões que responde as ausências e alterações dos estímulos sensoriais maternos através da ativação/inibição de seus circuitos neuronais apropriados(JAFFEE; PRICE, 2012; KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007b; KOJIMA et al., 2012b). A capacidade de maturar o sistema sensorial é inata aos filhotes, porém a construção do padrão estará associada com as informações que o ambiente irá fornecer ao indivíduo(MARLER, 2004). O efeito do contato materno na maturação de padrões de ingestão alimentar é observado em estudos com separação materna temporária, esses animais aumentam a ingestão de alimentos palatáveis e apresentam maior preferência por soluções doces(MANIAM; MORRIS, 2010; MICHAELS; HOLTZMAN, 2007). Desse modo podemos inferir que as alterações encontradas nos nossos animais, evidentemente no aumento da ingestão de alimentos palatáveis, podem ser organizadas de modo que compense o déficit do aporte nutricional e do vínculo materno e assim supostamente potencializar uma via que lhe garanta um maior abastecimento energético num ambiente de privação. Assim, o ambiente neonatal desses animais desmamados precocemente impõe um impulso para aproveitar ao máximo oportunidades de alimentação quando estão disponíveis, aumentando o reforço positivo de alimentos palatáveis.

A partir desses dados, outro experimento foi realizado para avaliar a via opioidérgica por ser responsável pelo impacto hedônico dos alimentos (liking). Assim, outro grupo experimental associou desmame precoce com um tratamento neonatal de naltrexona (inibidor inespecífico de receptores opioidérgicos). Os animais que foram tratados com naltrexona durante a lactação reverteram o padrão do desmame precoce e aumentam o tempo de reação a substância doce e diminuem a ingestão alimentar palatável, esse achado corrobora com o que se tem descrito na literatura sobre os efeitos da naltrexona. Análises experimentais demonstram que

aplicações de antagonistas inespecíficos dos receptores opioidérgicos diminuem o consumo de alimento palatável, mesmo quando administrado em doses baixas, insuficientes para modificar a ingestão de dieta padrão (sem reforço de recompensa)(RUDSKI; BILLINGTON; LEVINE, 1994). Assim, aplicações desse fármaco atenuam o consumo de alimento palatável tanto em animais alimentados *ad libitum*, como privados ou restritos, mas tem efeito limitado dose-dependente na ingestão de dieta padrão de biotério(BARBANO; CADOR, 2006; LEVINE et al., 1995). Além das diversas evidências que apontam o sistema opioidérgico com o consumo de dietas palatáveis, é importante também entender que essa relação também apresenta outro binômio: alimentos de preferência-opioides(MARKS-KAUFMAN, 1982; MARKS-KAUFMAN; KANAREK, 1980). Em animais de laboratório, injeções de morfina elevam a ingestão de carboidratos em ratos que preferem carboidratos, enquanto animais que preferem gordura, aumentam a ingestão de dietas ricas em gordura(GOSNELL; KRAHN; MAJCHRZAK, 1990). Similar a esse estudo, a infusão de agonista de receptor mu-opioide (MOR) diretamente no núcleo accumbens estimulou a ingestão de dieta hiperlipídica em animais que tinham preferência por gordura(NALEID et al., 2007). Dessa forma, a reversão do fenótipo de ingestão alimentar palatável aumentada dos animais desmamados precocemente está de acordo com o efeito inibitório do impacto hedônico e de preferências alimentares causadas pela naltrexona.

Outro ponto a ser analisado é que o bloqueio crônico de receptores opioidérgicos altera a manutenção da dieta sem afetar a iniciação(LEVINE et al., 1995; LEVINE; BILLINGTON, 2004). Esse padrão demonstra que os opioides afetam os aspectos relacionados a recompensa da alimentação, e não diretamente a movimentação relacionada ao alimento(LEVINE; BILLINGTON, 2004). Nesse estudo os efeitos do desmame precoce são justamente na recompensa da alimentação e não afetivamente na busca do alimento. Tomados em conjunto, esses dados nos revelam que agonistas e antagonistas opioidérgicos modificam a ingestão de alimentos, seleção de nutrientes, e especialmente, a ingestão de alimentos de preferência. Assim, podemos associar que as alterações quanto a maior preferência e consumo de alimentos palatáveis de animais desmamados precocemente (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2011), bem como as alterações

encontradas nesse estudo com alguma modificação persistente na via do sistema opioide.

As reações frente a uma substância doce também foram revertidas em animais tratados com naltrexona, o que nos leva a inferir que pode ter ocorrido primariamente uma alteração central na percepção dessas substâncias associada com modificações do sistema opioide. A naltrexona é bastante utilizada em tratamentos prolongados para dependência de álcool e drogas de abuso(ALTSHULER; PHILLIPS; FEINHANDLER, 1980; SAMSON; DOYLE, 1985; WEE et al., 2012). Seu uso é baseado em estudos experimentais que demonstraram que o bloqueio de receptores opioides diminuem o reforço positivo de padrões adictos(VOLPICELLI et al., 1992). Os resultados de ensaios clínicos com tratamento de naltrexona demonstram uma redução no apetite, taxas mais baixas de recaídas e consumo menos frequente de drogas de abuso em pacientes com transtornos de abuso(O'MALLEY et al., 1992; VOLPICELLI et al., 1992). O sistema endógeno de opioides é uma parte importante para o sistema de recompensa do cérebro(GOSNELL; LEVINE, 2009; KIEFFER, 1999). O álcool, as drogas de abuso e os alimentos palatáveis tendem a aumentar a liberação de opioides endógenos devido ao aumento do limiar de percepção de prazer, ativando o mecanismo de recompensa (VOLPICELLI et al., 1992). O tratamento com naltrexona atua justamente bloqueando os efeitos dos opioides endógenos livres e isso se traduz com uma diminuição do reforço positivo que a longo prazo diminui o limiar de percepção (VOLPICELLI et al., 1992). Esses dados corroboram com os resultados encontrados nesse estudo. O efeito do desmame precoce alterou padrões da via de recompensa, que são traduzidos numa percepção diminuída associada a um aumento da ingestão de alimentos palatáveis, padrão semelhante encontrado em pacientes com transtornos de abuso. Esses padrões foram revertidos, a partir do bloqueio dos receptores opioides e consequente atenuação dos opioides livres que sustentam os padrões adictos.

O bloqueio crônico dos receptores opioides e sua ação na ingestão alimentar frente a dose aguda de naltrexona cujo grupo tratado apresentou uma resistência a ação aguda é corroborado com dados que demonstram que o efeito crônico da naltrexona pode causar uma diminuição da sensibilidade a essa mesma

droga quando aplicado posteriormente em doses agudas(ALTSHULER; PHILLIPS; FEINHANDLER, 1980; RECAN et al., 1980; SPAGNOLO et al., 2014).

Tomados em conjunto, estes achados indicam que o desmame precoce apresenta consequências duradouras nos mecanismos de “liking” de recompensa alimentar com objetivo de se adaptar a um ambiente hostil. Além disso, alterações específicas nos opioides endógenos livre e sua afinidade com os receptores podem estar associados ao aumento do consumo de alimentos palatáveis em animais desmamados precocemente.

10 CONCLUSÃO

Os animais tratados com naltrexona durante a lactação reverteram o padrão do desmame precoce aumentando o tempo de reação a substância doce e diminuindo a ingestão alimentar palatável. Dessa forma, podemos sugerir que o desmame precoce causa alterações nos mecanismos de “*Liking*” do comportamento alimentar hedônico envolvido com o sistema opioide.

REFERÊNCIAS

- AL AÏN, S. et al. How does a newly born mouse get to the nipple? Odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses. **Developmental Psychobiology**, v. 55, n. 8, p. 888–901, 2013.
- ALTSHULER, H. L.; PHILLIPS, P. E.; FEINHANDLER, D. A. Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. **Life Sciences**, 1980.
- ANDERSON, E. J. P. et al. Regulation of feeding and energy homeostasis by ??-MSH. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 56, n. 4, p. T157–T174, 2016.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. **Human breast milk: A review on its composition and bioactivity**Early Human Development, 2015.
- APFELBAUM, M.; MANDENOFF, A. Naltrexone suppresses hyperphagia induced in the rat by a highly palatable diet. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 1, p. 89–91, 1981.
- AYRES, C. et al. Intrauterine Growth Restriction and the Fetal Programming of the Hedonic Response to Sweet Taste in Newborn Infants. **International Journal of Pediatrics**, 2012.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Preclinical experimental stress studies: Protocols, assessment and comparison. **European Journal of Pharmacology**, 2015.
- BARBANO, M. F.; CADOR, M. Differential regulation of the consummatory, motivational and anticipatory aspects of feeding behavior by dopaminergic and opioidergic drugs. **Neuropsychopharmacology**, 2006.
- BARRETT, J.; FLEMING, A. S. Annual research review: All mothers are not created equal: neural and psychobiological perspectives on mothering and the importance of individual differences. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 52, n. 4, p. 368–397, 2011.
- BELLISLE, F. et al. Sweetness, Satiation, and Satiety. **Journal of Nutrition**, 2012.
- BERRIDGE, K. C. **Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns**Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2000.
- BERRIDGE, K. C. Pleasures of the brain. **Brain and Cognition**, v. 52, n. 1, p. 106–128, 2003.
- BERRIDGE, K. C. Wanting and Liking: Observations from the Neuroscience and Psychology Laboratory. **Inquiry (Oslo)**, v. 52, n. 4, p. 1–18, 2009.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E.; ALDRIDGE, J. W. **Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning**Current Opinion in Pharmacology, 2009.

BERTHOUD, H. R. Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. **Physiology and Behavior**, v. 91, n. 5, p. 486–498, 2007.

BIRCH, L. L. Development of Food Preferences. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 41–62, 1999.

BIRKE, L. I. A.; SADLER, D. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. **Developmental Psychobiology**, v. 20, n. 1, p. 85–99, 1987.

BJÖRNTORP, P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, 2001.

BODNAR, R. J.; KLEIN, G. E. **Endogenous opiates and behavior: 2003** *Peptides*, 2004.

BOURNE, M. C.; BOURNE, M. C. Texture, Viscosity, and Food. In: **Food Texture and Viscosity**. [s.l: s.n.]. p. 1–32.

BRITT, M. D.; WISE, R. A. Ventral tegmental site of opiate reward: antagonism by a hydrophilic opiate receptor blocker. **Brain Research**, 1983.

BROWN, D. R.; HOLTZMAN, S. G. Suppression of deprivation-induced food and water intake in rats and mice by naloxone. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 11, n. 5, p. 567–573, 1979.

BRUNSTROM, J. M. Associative learning and the control of human dietary behavior. **Appetite**, v. 49, n. 1, p. 268–271, 2007.

CALDJ, C. et al. The effects of early rearing environment on the development of GABA(A) and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 219–229, 2000.

CALO', G. et al. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. **British journal of pharmacology**, 2000.

CHAMBERS, L.; MCCRICKERD, K.; YEOMANS, M. R. **Optimising foods for satiety** *Trends in Food Science and Technology*, 2015.

CHAN, J. R.; PHILLIPS, L. J.; GLASER, M. Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 18, p. 10459–64, 1998.

CHAN, P. T.; DOAN, S. N.; TOMPSON, M. C. Stress generation in a developmental context: The role of youth depressive symptoms, maternal depression, the parent-child relationship, and family stress. **Journal of Family Psychology**, 2014.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. **Nature Reviews Neuroscience**, 2003.

CHARLOTTE O. LADD, MICHAEL J. OWENS, C. B. N. Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. **Endocrinology**, v. 137, n. January, 1996.

CHELAZZI, L. et al. A neural basis for visual search in inferior temporal cortex. **Nature**, v. 363, n. 6427, p. 345–347, 1993.

CRAMER, C. P.; THIELS, E.; ALBERTS, J. R. Weaning in rats: I. Maternal behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 23, n. 6, p. 479–493, 1990.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. **The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2005.

CURRIE, P. J. **Integration of hypothalamic feeding and metabolic signals: Focus on neuropeptide Y** *Appetite*, 2003.

DA SILVA LIMA, N. et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, 2011.

DA SILVA, M. C. et al. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 5, n. 03, p. 219–228, 2014.

DALLMAN, M. F. et al. Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during stress: feedback, facilitation and feeding. **Seminars in Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 205–213, 1994.

DAOURA, L.; HAAKER, J.; NYLANDER, I. Early Environmental Factors Differentially Affect Voluntary Ethanol Consumption in Adolescent and Adult Male Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 2011.

DE KLOET, E. R. et al. **Brain corticosteroid receptor balance in health and disease** *Endocrine Reviews*, 1998.

DE WIJK, R. A et al. Food aroma affects bite size. **Flavour**, v. 1, n. 1, p. 3, 2012.

DEROCHE, V. et al. Repeated corticosterone administration sensitizes the locomotor response to amphetamine. **Brain Research**, v. 584, n. 1–2, p. 309–313, 1992.

DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3839–3847, 1993.

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.

ENTRINGER, S. et al. **Fetal programming of body composition, obesity, and metabolic function: The role of intrauterine stress and stress biology** *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012.

ENTRINGER, S.; WADHWA, P. D. Developmental programming of obesity and metabolic dysfunction: role of prenatal stress and stress biology. **Nestlé Nutrition Institute workshop series**, 2013.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 61–73, 2005.

EVANS, K. R.; VACCARINO, F. J. Amphetamine- and morphine-induced feeding: Evidence for involvement of reward mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 1, p. 9–22, 1990.

FERENCZI, S. et al. Changes in metabolic-related variables during chronic morphine treatment. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 3, p. 323–330, 2010.

FIELDS, H. L. et al. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. **Annu Rev Neurosci**, v. 30, p. 289–316, 2007.

FIELDS, H. L.; MARGOLIS, E. B. **Understanding opioid rewardTrends in Neurosciences**, 2015.

GAHAGAN, S. **Development of eating behavior: Biology and contextJournal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, 2012.

GAILLET, M. et al. Priming effects of an olfactory food cue on subsequent food-related behaviour. **Food Quality and Preference**, v. 30, n. 2, p. 274–281, 2013.

GLASS, M. J.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, A. S. Naltrexone administered to central nucleus of amygdala or PVN: neural dissociation of diet and energy. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 279, n. 1, p. R86–92, 2000.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; MITCHELL, M. D. Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. **Genome medicine**, v. 2, n. 2, p. 14, Jan. 2010.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5691, p. 1733–6, 17 Sep. 2004.

GOEDERS, N. E.; GUERIN, G. F. Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration in rats. **Neuroendocrinology**, v. 64, n. 5, p. 337–348, 1996a.

GOEDERS, N. E.; GUERIN, G. F. Effects of surgical and pharmacological adrenalectomy on the initiation and maintenance of intravenous cocaine self-administration in rats. **Brain research**, v. 722, n. 1–2, p. 145–152, 1996b.

GOODALE, M. A.; GOODALE, M. A. How (and why) the visual control of action differs from visual perception. 2014.

GOREWIT, R. C. et al. Current concepts on the role of oxytocin in milk ejection. **Journal of dairy science**, v. 66, n. 10, p. 2236–50, Oct. 1983.

GOSNELL, B. A.; KRAHN, D. D.; MAJCHRZAK, M. J. The effects of morphine on diet selection are dependent upon baseline diet preferences. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 37, n. 2, p. 207–212, 1990.

GOSNELL, B. A; LEVINE, A S. Reward systems and food intake: role of opioids. **International journal of obesity (2005)**, v. 33 Suppl 2, p. S54-8, 2009.

GREGERSON, K. A. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, v. 80, n. 4, p. 1703–1726, 2006.

GRIFFIOEN-ROOSE, S. et al. Satiety due to equally palatable sweet and savory meals does not differ in normal weight young adults. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 11, p. 2093–2098, 2009.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. **Brain research**, v. 143, n. 2, p. 281–97, Mar. 1978.

GROESZ, L. M. et al. What is eating you? Stress and the drive to eat. **Appetite**, 2012.

GROSSMAN, H. C. et al. Interrelationships between ?? opioid and melanocortin receptors in mediating food intake in rats. **Brain Research**, v. 991, n. 1–2, p. 240–244, 2003.

HAGAN, M. M. et al. Opioid receptor involvement in the effect of AgRP- (83-132) on food intake and food selection. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 3, p. R814-21, 2001.

HAGHIGHI, A et al. Opioid receptor mu 1 gene, fat intake and obesity in adolescence. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. October 2012, p. 63–8, 2014.

HALL, W. G.; ROSENBLATT, J. S. Development of nutritional control of food intake in suckling rat pups. **Behavioral Biology**, v. 24, n. 4, p. 413–427, 1978.

HATTON, G. I.; WANG, Y.-F. Neural mechanisms underlying the milk ejection burst and reflex. **Progress in brain research**, v. 170, p. 155–66, Jan. 2008.

HAVERMANS, R. C. “You Say it’s Liking, I Say it’s Wanting ...”. On the difficulty of disentangling food reward in man. **Appetite**, v. 57, n. 1, p. 286–294, 2011.

HEINRICHS, S. C. et al. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. **Brain Research**, 1993.

HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2013.

HORTA, B. . et al. **Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses**World Health Organisation. [s.l: s.n.].

INOUE, K. et al. Prefrontal and striatal dopamine metabolism during enhanced rebound hyperphagia induced by space restriction - A rat model of binge eating.

Biological Psychiatry, 1998.

ISHII, Y. et al. Palatability, food intake and the behavioural satiety sequence in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 1, p. 37–47, 2003.

ITO, A. et al. Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 171, n. 1, p. 87–93, 2006.

IWASAKI, S. et al. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. **Physiology & behavior**, 2000.

JAFFEE, S. R.; PRICE, T. S. The implications of genotype–environment correlation for establishing causal processes in psychopathology. **Development and Psychopathology**, v. 24, n. Special Issue 04, p. 1253–1264, 2012.

JOHNSON, S. W.; NORTH, R. A. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. **The Journal of Physiology**, 1992.

JURUENA, M. F. An integrative science approach: Neuroscience in the DSM-V and ICD-11. **Acta Neuropsychiatrica**, 2011.

KALANDA, B. F.; VERHOEFF, F. H.; BRABIN, B. J. Breast and complementary feeding practices in relation to morbidity and growth in Malawian infants. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2006.

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.

KARATAYEV, O. et al. Hypothalamic injection of non-opioid peptides increases gene expression of the opioid enkephalin in hypothalamic and mesolimbic nuclei: Possible mechanism underlying their behavioral effects. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2423–2431, 2009.

KELLE, A. E.; STINUS, L.; IVERSEN, S. D. Interactions between d-Ala-Met-enkephalin, A10 dopaminergic neurones, and spontaneous behaviour in the rat. **Behavioural Brain Research**, 1980.

KEVERNE, E. B.; CURLEY, J. P. Epigenetics, brain evolution and behaviour. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 398–412, 2008.

KIEFFER, B. L. **Opioids: First lessons from knockout mice** *Trends in Pharmacological Sciences*, 1999.

KIKUSUI, T. et al. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 96–103, 2006.

KIKUSUI, T.; FACCIDOMO, S.; MICZEK, K. A. Repeated maternal separation: Differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. **Psychopharmacology**, v. 178, n. 2–3, p. 202–210, 2005.

KIKUSUI, T.; ICHIKAWA, S.; MORI, Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in

mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 5, p. 762–772, 2009.

KIKUSUI, T.; KIYOKAWA, Y.; MORI, Y. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain research**, v. 1133, n. 1, p. 115–22, Feb. 2007a.

KIKUSUI, T.; KIYOKAWA, Y.; MORI, Y. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain research**, v. 1133, n. 1, p. 115–22, 16 Feb. 2007b.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 427–431, 2009.

KOJIMA, S. et al. Maternal contact differentially modulates central and peripheral oxytocin in rat pups during a brief regime of mother-pup interaction that induces a filial huddling preference. **Journal of neuroendocrinology**, v. 24, n. 5, p. 831–40, May 2012a.

KOJIMA, S. et al. Maternal contact differentially modulates central and peripheral oxytocin in rat pups during a brief regime of mother-pup interaction that induces a filial huddling preference. **Journal of neuroendocrinology**, v. 24, n. 5, p. 831–40, 1 May 2012b.

KOLETZKO, B. et al. **Infant feeding and later obesity risk**. Advances in Experimental Medicine and Biology. **Anais...**2009

KOOLHAAS, J. M. et al. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 77, p. e4367, 2013.

KOTZ, C. M. et al. The effect of norbinaltorphimine, μ -funaltrexamine and naltrindole on NPY-induced feeding. **Brain Research**, v. 631, n. 2, p. 325–328, 1993.

KUHN, C. M.; SCHANBERG, S. M. Responses to maternal separation: Mechanisms and mediators. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, n. 3–4, p. 261–270, 1998.

LA FLEUR, S. E. et al. The snacking rat as model of human obesity: Effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. **International Journal of Obesity**, 2014.

LACEY, M. G.; MERCURI, N. B.; NORTH, R. A. Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. **The Journal of Physiology**, 1987.

LADD, C. O. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Progress in brain research**, v. 122, n. February 2000, p. 81–103, 2000.

LE MAGNEN, J. et al. Pain modulating and reward systems: A single brain mechanism? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 12, n. 5, p. 729–733, 1980.

LE MERRER, J. et al. Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiological reviews**, v. 89, n. 4, p. 1379–412, 1 Oct. 2009.

LEVINE, A. S. et al. Naloxone blocks that portion of feeding driven by sweet taste in food-restricted rats. **The American journal of physiology**, 1995.

LEVINE, A. S. et al. Extreme sensitivity of diabetic mice to naloxone- induced suppression of food intake. **Physiology and Behavior**, 28: 987-989. **LEVINE 1982**, v. 28, p. 987–989, 1982.

LEVINE, A. S.; BILLINGTON, C. J. **Opioids as agents of reward-related feeding: A consideration of the evidence** **Physiology and Behavior**, 2004.

LEVINE, S. et al. Time Course of the Effect of Maternal-Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Infant Rat. **Developmental Psychobiology**, v. 24, n. 8, p. 547–558, 1991.

LEVY, B. T. et al. Mothers , Breast Milk , and Nursing Infants. n. June, p. 1066–1078, 2004.

LIU, D. et al. Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypthalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659–1662, 1997.

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

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**, 2000.

LÖVBLAD, K. O.; SCHALLER, K.; ISABEL VARGAS, M. The fornix and limbic system. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 35, n. 5, p. 459–473, 2014.

LUCASSEN, P. J. et al. Prenatal stress reduces postnatal neurogenesis in rats selectively bred for high, but not low, anxiety: possible key role of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **The European journal of neuroscience**, 2009.

LUCION, A. B.; BORTOLINI, M. C. Mother-pup interactions: Rodents and humans. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. FEB, p. 1–5, 2014.

LYNCH, W. C.; BURNS, G. Opioid effects on intake of sweet solutions depend both on prior drug experience and on prior ingestive experience. **Appetite**, v. 15, n. 1, p. 23–32, 1990.

MACDONALD, A. F.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, A. S. Effects of the opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the ventral tegmental area and in the nucleus accumbens shell region in the rat. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 285, n. 5, p. R999–R1004, 2003.

MACHT, M. **How emotions affect eating: A five-way model** **Appetite**, 2008.

MAH, L.; SZABUNIEWICZ, C.; FIOCCO, A. J. Can anxiety damage the brain? **Current Opinion in Psychiatry**, v. 29, n. 1, p. 56–63, 2016.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. **Psychoneuroendocrinology**, 2010.

MARCHIORI, D.; WAROQUIER, L.; KLEIN, O. Smaller Food Item Sizes of Snack Foods Influence Reduced Portions and Caloric Intake in Young Adults. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 5, p. 727–731, 2011.

MARKS-KAUFMAN, R. Increased fat consumption induced by morphine administration in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 1982.

MARKS-KAUFMAN, R.; KANAREK, R. B. Morphine selectively influences macronutrient intake in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 1980.

MARLER, P. Innateness and the instinct to learn. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 76, n. 2, p. 189–200, 2004.

MARSEGLIA, L. et al. **Obesity and breastfeeding: The strength of association** *Women and Birth*, 2015.

MASON, A. E. et al. Putting the brakes on the “drive to eat”: Pilot effects of naltrexone and reward-based eating on food cravings among obese women. **Eating behaviors**, v. 19, n. July, p. 53–56, 2015.

MATSUI, A. et al. Separate GABA afferents to dopamine neurons mediate acute action of opioids, development of tolerance, and expression of withdrawal. **Neuron**, 2014.

MELA, D. J. **Eating for pleasure or just wanting to eat? Reconsidering sensory hedonic responses as a driver of obesity** *Appetite*, 2006.

MICHAELS, C. C.; HOLTZMAN, S. G. Enhanced sensitivity to naltrexone-induced drinking suppression of fluid intake and sucrose consumption in maternally separated rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 4, p. 784–796, 2007.

MIRESCU, C.; PETERS, J. D.; GOULD, E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. **Nature Neuroscience**, 2004.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, Jan. 1993.

MURPHY, C.; CAIN, W. S.; BARTOSHUK, L. M. Mutual Action of Taste and Olfaction. **Sensory Processes**, v. 1, n. 3, p. 204–211, 1977.

NAKAMURA, K. et al. The influence of early weaning on aggressive behavior in mice. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 12, p. 1347–1349, 2003.

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.

NALEID, A. M. et al. Paraventricular opioids alter intake of high-fat but not high-sucrose diet depending on diet preference in a binge model of feeding. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2007.

REIS, N. Nando Reis e Os Infernais Ao Vivo. Por onde andei [2004]. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=0H5y-GDTrHc>. Acesso em 17 jun 2019

NICOLL, R. A.; ALGER, B. E.; JAHR, C. E. Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. **Nature**, 1980.

NOEL, M. B.; WISE, R. A. Ventral tegmental injections of a selective ?? or ?? opioid enhance feeding in food-deprived rats. **Brain Research**, v. 673, n. 2, p. 304–312, 1995.

O'MALLEY, S. S. et al. Naltrexone and Coping Skills Therapy for Alcohol Dependence: A Controlled Study. **Archives of General Psychiatry**, 1992.

OLIVEIRA, L. DOS S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes**, 2011.

OLMSTEAD, M. C.; FRANKLIN, K. B. J. The development of a conditioned place preference to morphine: Effects of microinjections into various CNS sites. **Behavioral Neuroscience**, 1997.

ONO, M. et al. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 1103–1110, 2008.

OWEN, C. G. et al. Effect of Infant Feeding on the Risk of Obesity Across the Life Course: A Quantitative Review of Published Evidence. **Pediatrics**, 2005.

PANDIT, R. et al. Neurobiology of overeating and obesity: The role of melanocortins and beyond. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, n. 1, p. 28–42, 2011.

PARENT, C. I.; MEANEY, M. J. The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 50, n. 8, p. 767–776, 2008.

PARFITT, D. B. et al. Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. **Brain Research**, 2004.

PARKER, K. E. et al. Central amygdala opioid transmission is necessary for increased high-fat intake following 24-h food deprivation, but not following intra-accumbens opioid administration. **Behavioural Brain Research**, v. 260, p. 131–138, 2014.

PECINA, S. et al. Hyperdopaminergic Mutant Mice Have Higher “ Wanting ” But Not “ Liking ” for Sweet Rewards. **The journal of neuroscience**, 2003.

PECINA, S. Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do μ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 50, p. 11777–11786, 2005.

PECIÑA, S.; BERRIDGE, K. C. Opioid eating site in accumbens shell mediates food intake and hedonic “liking”: map based on microinjection Fos plumes. **Brain Research**, v. 863, p. 71–86, 2000.

PEIXOTO-SILVA, N. et al. Bromocriptine treatment at the end of lactation prevents hyperphagia, higher visceral fat and liver triglycerides in early-weaned rats at adulthood. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2017.

PENNOCK, R. L.; HENTGES, S. T. Differential expression and sensitivity of pre- and postsynaptic opioid receptors regulating hypothalamic proopiomelanocortin neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 281–288, 2011.

PICCINNI, A. et al. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, 2008.

PLAUT, S. M.; DAVIS, J. M. Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels. **Physiology and Behavior**, v. 8, n. 1, p. 43–51, 1972.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, v. 18, n. 3, p. 195–200, 1993.

RECANT, L. et al. Naltrexone reduces weight gain, alters “ β -endorphin”, and reduces insulin output from pancreatic islets of genetically obese mice. **Peptides**, 1980.

RITTER, A. J. Naltrexone in the treatment of heroin dependence: relationship with depression and risk of overdose. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, 2002.

ROBINSON, E. et al. Dishware size and snack food intake in a between-subjects laboratory experiment. **Public Health Nutrition**, v. 19, n. 04, p. 1–5, 2015.

ROCHA, M. L. M. et al. Undernutrition during early life alters neuropeptide Y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. **Neuroscience**, v. 256, p. 379–91, 3 Jan. 2014.

ROGERS, J.; RAIMUNDO, A. H.; MISIEWICZ, J. J. Cephalic phase of colonic pressure response to food. **Gut**, v. 34, n. September 1992, p. 537–543, 1993.

ROMAN, C. W.; DERKACH, V. A.; PALMITER, R. D. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. **Nature communications**, v. 7, n. May, p. 11905, 2016.

ROPER, S. D. **Taste buds as peripheral chemosensory processors** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2013.

ROSENFELD, P. et al. Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 13, n. 4, p. 295–319, 1993.

RUDSKI, J. M. et al. Behavioral effects of naloxone on neuropeptide Y-induced feeding. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 4, p. 771–777, 1996.

RUDSKI, J. M.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, A. S. Naloxone's effects on operant responding depend upon level of deprivation. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 1994.

RUI, L. Brain regulation of energy balance and body weight. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 14, n. 4, p. 387–407, Dec. 2013.

RUSHWORTH, M. F. S. et al. **Action sets and decisions in the medial frontal cortex** *Trends in Cognitive Sciences*, 2004.

SAKURAI, T. et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, v. 92, n. 4, p. 573–85, 20 Mar. 1998.

SALAMONE, J. D.; CORREA, M. **The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine** *Neuron*, 2012.

SAMSON, H. H.; DOYLE, T. F. Oral ethanol self-administration in the rat: Effect of naloxone. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 22, n. 1, p. 91–99, 1 Jan. 1985.

SCHICK, R. R. et al. Neuropeptide Y and food intake in fasted rats: effect of naloxone and site of action. **Brain Research**, v. 552, n. 2, p. 232–239, 1991.

SCHMIDT, S. et al. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: Molecular mechanisms and clinical relevance. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, p. S45–S55, 2004.

SCHWARTZ, E.; ROWE, F. A. Olfactory bulbectomy: Influences on maternal behavior in primiparous and multiparous rats. **Physiology and Behavior**, v. 17, n. 6, p. 879–883, 1976.

SCOTT, K. **The sweet and the bitter of mammalian taste** *Current Opinion in Neurobiology*, 2004.

SEUVRE, A. M. et al. Influence of the composition and the structure of different media on the release of aroma compounds. **Lait**, v. 84, n. 3, p. 305–316, 2004.

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.

SILVEIRA, P. P. et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2010.

SMALL, D. M.; PRESCOTT, J. **Odor/taste integration and the perception of flavor**. *Experimental Brain Research. Anais...*2005

SMITH, F. et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 298, n. 3, p. G352–G363, 2010.

SOMINSKY, L.; SPENCER, S. J. **Eating behavior and stress: A pathway to obesity***Frontiers in Psychology*, 2014.

SPAGNOLO, P. A. et al. Effects of naltrexone on neural and subjective response to alcohol in treatment-seeking alcohol-dependent patients. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 2014.

STATNICK, M. A. et al. Peptides that regulate food intake: antagonism of opioid receptors reduces body fat in obese rats by decreasing food intake and stimulating lipid utilization. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 284, n. 6, p. R1399–R1408, 2003.

STEVENSON, R. J. **An initial evaluation of the functions of human olfaction***Chemical Senses*, 2009.

SULLIVAN, R. M.; HOLMAN, P. J. Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: The role of corticosterone. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 835–844, 2010.

SWEET, D. C.; LEVINE, A. S.; KOTZ, C. M. Functional opioid pathways are necessary for hypocretin-1 (orexin-A)-induced feeding. **Peptides**, v. 25, n. 2, p. 307–314, 2004.

TALIAZ, D. et al. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. **Molecular Psychiatry**, 2010.

TAYLOR, A. J. Physical chemistry of flavour. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 33, p. 53–62, 1998.

THOMPSON, D. A.; WELLE, S. L.; LILAVLVAT, U. Printed in the U . S . A . Pergamon Press OPIATE RECEPTOR BLOCKADE IN MAN REDUCES 2-DEOXY-D-GLUCOSE- INDUCED FOOD INTAKE BUT NOT HUNGER , THIRST , AND HYPOTHERMIA Luc Penicaud , and Robert G . Campbell From the Endocrine-Metabollsm Unit Monroe Community H. v. 31, n. 8, p. 847–852, 1982.

TODRANK, J.; HETH, G.; RESTREPO, D. Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. n. December 2010, p. 1949–1955, 2011.

TOWNSEND, E.; PITCHFORD, N. J. Baby knows best? The impact of weaning style on food preferences and body mass index in early childhood in a case-controlled sample. **BMJ Open**, v. 2, n. 1, p. e000298–e000298, 2012.

TRENCHARD, E.; SILVERSTONE, T. Naloxone reduces the food intake of normal

human volunteers. **Appetite**, v. 4, n. 1, p. 43–50, 1983.

TRUXELL, E. M.; MOLINA, J. C.; SPEAR, N. E. Ethanol intake in the juvenile, adolescent, and adult rat: Effects of age and prior exposure to ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 2007.

TSANKOVA, N. M. et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature Neuroscience**, 2006.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. **Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress**. Journal of Psychosomatic Research. **Anais...**2002

VAN ZESSEN, R. et al. Activation of VTA GABA Neurons Disrupts Reward Consumption. **Neuron**, v. 73, n. 6, p. 1184–1194, 2012.

VETULANI, J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. **Pharmacological reports : PR**, 2013.

VOLPICELLI, J. R. et al. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. **Archives of general psychiatry**, 1992.

VON WERNE BAES, C. et al. **Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: Glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress - A systematic review**Acta Neuropsychiatrica, 2012.

WADHERA, D.; CAPALDI-PHILLIPS, E. D. **A review of visual cues associated with food on food acceptance and consumption**Eating Behaviors, 2014.

WALKER, C. D. et al. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 364–382, 2004.

WANSINK, B. Environmental Factors That Increase the Food Intake and Consumption Volume of Unknowing Consumers *. **Annu. Rev. Nutr**, v. 24, n. 217, p. 455–79, 2004.

WEE, S. et al. A combination of buprenorphine and naltrexone blocks compulsive cocaine intake in rodents without producing dependence. **Science Translational Medicine**, 2012.

WELTENS, N.; ZHAO, D.; VAN OUDENHOVE, L. **Where is the comfort in comfort foods? Mechanisms linking fat signaling, reward, and emotion**Neurogastroenterology and Motility, 2014.

WILLNER, P. et al. The mesolimbic dopamine system. In: **The mesolimbic dopamine system from motivation to action**. [s.l: s.n.]. p. 3–15.

WOODSIDE, B. et al. Many mouths to feed: The control of food intake during lactation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 33, n. 3, p. 301–314, 2012.

WOOLEY, S. C.; WOOLEY, O. W. Salivation to the sight and thought of food: a new measure of appetite. **Psychosomatic medicine**, v. 35, n. 2, p. 136–142, 1973.

YEOMANS, M. R. Palatability and the Micro-structure of Feeding in Humans: the Appetizer Effect. **Appetite**, v. 27, n. November 1996, p. 119–133, 1996.

YEOMANS, M. R. Taste, palatability and the control of appetite. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, n. 04, p. 609–615, 1998.

YEOMANS, M. R.; GRAY, R. W. Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 6, p. 713–728, 2002.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring. **The British journal of nutrition**, n. 2015, p. 1–10, 2015.

ZHANG, M.; CAI, J. X. Neonatal tactile stimulation enhances spatial working memory, prefrontal long-term potentiation, and D1 receptor activation in adult rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 4, p. 397–406, 2008.

ZHANG, M.; KELLEY, A. E. Intake of saccharin, salt, and ethanol solutions is increased by infusion of a mu opioid agonist into the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 4, p. 415–423, 2002.

APÊNDICE A- CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

Recife, 23 de agosto de 2017.

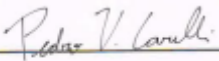
Ofício nº 84/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Sandra Lopes de Souza**
Departamento de Anatomia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0052/2016

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito do desmame precoce sobre o comportamento alimentar hedônico e padrões de interação social em ratos: papel da via opiodérgica**", registrada com o nº 0052/2016 sob a responsabilidade de **Prof.ª Sandra Lopes de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 05/2018
Espécie/ linhagem/raça	Ratos heterogênicos/Wistar
Nº de animais	120
Peso/Idade	220g / 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Bioterio do Departamento de Nutrição - CCS/UFPE

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1901584

**APÊNDICE B- ARTIGO CIENTÍFICO PRODUTO DIRETO DA TESE SUBMETIDO
A PHYSIOLOGY & BEHAVIOR**

**EARLY WEANING DECREASES SUCROSE TASTE REACTIVITY BUT DOES NOT
MODIFY FOOD REWARD SEEKING IN ADULT MALE RATS**

Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida ^a, Juliet Araújo de Souza ^a, Gabriel Araújo
Tavares ^b, Matilde Cesiana da Silva ^c; Taisy Cinthia Ferro Cavalcante ^d, Amanda Alves
Marcelino da Silva ^e, Sandra Lopes de Souza ^f

^a *Postgraduate neuropsychiatry and behavioral sciences, Federal University of
Pernambuco, Recife, Brazil.*

^b *Postgraduate nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.*

^c *Academic Center of Vitória de Santo Antão, Federal University of Pernambuco,
Recife, Brazil*

^d *Nutrition college, University of Pernambuco, Recife, Brazil.*

^e *Nursing college, University of Pernambuco, Recife, Brazil*

^f *Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.*

*Corresponding author; Av. Prof, Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-
PE-CEP: 50670901– Departamento de anatomia – Cidade Universitária– Recife, PE
– Brasil. Fone PABX (81) 2126.8000/ FAX (81) 21268029. sandra.lsouza2@ufpe.br

Keywords: Early Weaning; Palatable Food; Reward system

Abstract

The World Health Organization recommends exclusive breastfeeding until six months of age, from that age up to two years, supplemented with other foods. Breast milk is the most complete nutritional source for adequate growth and development of infants and children, providing adequate support to the nutritional needs and immunoprotection to be developed in children. In addition to maternal milk, mother-child physical contact will stimulate the maturation of neurobehavioral patterns that will adapt the individual to the environment being developed. Weaning when it does not occur naturally is associated with several metabolic changes, such as obesity and overweight, in the short and long term, favoring mammals to develop changes in their eating behavior. Studies have shown that laboratory animals that were early weaned to present changes at the satiety point and tend to prefer palatable foods. The food reward system is responsible for the incentive of pleasure in food intake and has the same neural mechanisms of drugs of abuse. This system is particularly altered in animals that do not receive breast milk in the recommended time, leading to situations of addiction. Thus, the present study aimed to evaluate if early weaning is capable of interfering with the hedonic eating behavior of rats. The experimental groups were trained according to the weaning period of each litter. The animals were separated according to the day of weaning: Early Weaning Group (D15) - animals weaned on the 15th postnatal day; Control Group (D30) - weaned animals on the 30th postnatal day. Initially, the behavioral patterns evaluated were palatable food intake after acute food stress and behavioral depression-like patterns. In addition, the runway task incentive, taste reactivity testing and palatable food intake were evaluated. D15 animals showed an increase in behavioral depression-like patterns. In the experiments of food reward, it was found that the animals that were submitted to the early weaning (D15) present a decreases sucrose taste reactivity but does not modify food reward seeking in adult male rats. Thus, we can conclude that early weaning promotes changes in the "Liking" mechanisms of the hedonic eating behavior.

1. INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), exclusive breastfeeding is recommended until six months of age, and from that age up to two years, supplemented with other foods (OMS, 2017). Breast milk is the most complete nutritional source to be provided for the proper growth and development of infants and children because its composition is balanced with macronutrients, micronutrients, hormones and antibodies that provide adequate support to the nutritional needs and immunoprotein to be developed in children [1]. In addition, maternal physical contact is important for the exchange of stimuli that will ensure that the child adapts to the environment in which it is being developed, from the social protection to the maturation of neural characteristics [2].

Breast milk is associated with a reduced risk of developing various metabolic disorders, such as obesity and / or overweight [3]. Several studies have shown that childhood obesity is associated with a reduction in the optimal breastfeeding time [4]. In addition, Horta et al. In 2007 also showed that breast milk reduces the risk of obesity in adulthood by 22%. This occurs, therefore, breast milk has the ability to self-regulate food intake and adjust the individual's energy balance[5]. This energy regulation occurs early in the neonatal period and in childhood and can guide the individual in the regulation of appetite and preference for certain foods and flavors [5]. Corroborating these data, laboratory animal studies show changes in food intake mechanisms when these animals are subjected to early weaning [6,7]. A study of satiety behavior in rats that were weaned early showed that they had a delay of their satiety point when compared to the control group [7]. Another analyzed data was that the weaned animals tend to increase the preference for food by hypercaloric diets and by palatable foods [6].

The neuronal pathways that coordinate the eating behavior are driven by several factors. The act of eating can be triggered by metabolic needs, hedonic unity (through reward mechanisms) or an interaction of the two units (through several neural circuits that perform this interface).[8]. Hedonic pathways are stimulated by palatable foods, rich in lipids and carbohydrates. (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). The food reward system is associated with the psychological and neurobiological events that produce the conscious and unconscious sensation of

pleasure in the individual. [9]. When this pathway is activated increases the risk for a behavioral response that produces a beneficial result (pleasure), that is positive reinforcement [9].

The food reward system is mainly responsible for the hedonic control of eating behavior and is particularly altered in individuals who have suffered early weaning, especially in ways which enhance addiction mechanisms that use the same paths of food reward [10–12].

Studies show that individuals who were not properly breastfed tend to have a greater propensity to abuse drugs such as alcohol and cocaine [13,14]. The literature describes three different reward components: "Liking", which is the hedonic impact of the experience, "Wanting" a kind of motivation incentive that promotes the seeking and the intake of rewards, and "Learning" that makes predictions and associations to past beneficial events (BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009). Although many data point to the various addiction behaviors associated with breastfeeding time, there are few articles in the literature on food reward and how these changes are found in patterns of hedonic eating behavior. Thus, this study aims to evaluate behavioral patterns of food reward system in rats weaned early.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Wistar rats, aged between 0 and 120 days old, originated from the Department of Nutrition's colony from the University Federal de Pernambuco – Brazil. Virgin female Wistar rats weighing 250–300 g was obtained and maintained in the laboratory with an inverted light/dark cycle of 12 h (lights on at 6:00 PM) for 15 days for adaptation, with water and a standard diet (Purina do Brasil S/A) ad libitum. After the adaptation period, females were assigned in a proportion of two females for one male. The day of the birth was considered day zero. Day one after birth, pups from different mothers were mixed and the male pups were separated. After, only the male pups were distributed, eight male pups per dam. The experimental groups were classified in accordance with the weaning period. The pups from the D15 group

(early weaning) were separated from the mother on the 15th postnatal day. The pups from the D30 group (control 30 days) were separated from the mother on the 30th postnatal day. After the separation from their mothers, the pups from D15 group were maintained together in their cage original (eight pups per cage) from day weaning to day 30. On the 30th postnatal day, animals from all groups were housed in individual acrylic cages (54 cm × 30 cm × 20 cm) for realization of the experimental procedures. All experiments were performed in accordance with recommendations from the Comitê Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA and were approved by the Comissão de Ética em Experimentação Animal from Centro de Biociências from the Universidade Federal de Pernambuco.

2.2 Body Weight

We assessed weight gain during 1,7,14,21, and at 30, 60, 90, and 120 days of life(D15, n = 8, D30, n = 8). Measurements were obtained with on a Marte XL 500, class II scale.

2.3 Tail Suspension Test

The tail suspension test was performed to study depression-like behavior [15]. At 60 days old the animals(D15, n = 8, D30, n = 8) will be subjected to this test, which will consist of suspending the animal by its tail in a metallic device fixed to the wall at 1,5 m from the ground. The fixation of this animal will be carried out by a small elastic band that will connect the tail of the animal to the apparatus. To avoid skin lesions, 2 minutes before the test, the distal portion of the animal's tail will be coated with an adhesive foam (Reston ®). Each animal will remain suspended for 6 minutes and the following patterns will be timed: immobility and diffuse mobility.

2.4 Palatable food intake after acute stress

At 120 days of age the animals (D15, n = 8, D30, n = 8) were evaluated for the average consumption of palatable food (Chocolate Bauducco® Cookies) for three consecutive days, for one hour, after acute stress[16]. Food stress was induced by

the introduction of a palatable diet into a container that did not allow feeding of the animal. In this way, the fasting animal obtained only visual and olfactory information from the food for twenty minutes. The experiment always occurred at the same time (acute stress between 10: 40 and 11hs and consumption between 11hs and 12hs). A digital electronic scale was used, brand Marte XL 500, class II, maximum capacity 500g (smaller division 0.001g).

2.5 Palatable food intake

At the age of 120 days the rats(D15, n = 8, D30, n = 8) from the control and early weaning groups were housed in individual cages for adaptation to isolation for 10 days. Soon after this period, 30 g of palatable diet (Cookies Bauducco® 500 kcal/100 g) were offered to the rats in their cages at the same time of day, between 12:00hs and 13:00hs. The amount of food ingested (g) was considered as the difference between the amount of food offered and that rejected within 1 h.

2.6 Runway task incentive

At 45 days old the animals(D15, n = 8, D30, n = 8) were subjected to the runway task incentive to assess “Learning” and “Wanting”[17,18] after food deprivation for 4 h. This behavioural paradigm generates learning curves and measures the speed and path travelled to investigate the animal's motivation for the stimulation reward. The test was performed between 12:00 and 14:00. The structure of the runway consisted of a runner (140 × 14 × 30 cm) with two boxes (19 × 14 × 30 cm) located at the beginning and end of the runway. The distance varied according to the session day. The boxes were made of acrylic, while the centre was polypropylene. Training sessions (5 min each) were conducted for 11 sessions on alternate days (22 days). In the first three sessions (adaptation), the rats were placed directly on the target box (with the doors closed) for 5 min with access to reward (Cookies Bauducco® 500 kcal/100 g). In the fourth training session, the initial box was located 15 cm from the target box. The animal was in the initial box for 30 s with the door closed; when it was raised, the animal could continue to the centre. If the animal did not come out of the initial box within 3 min, it was gently moved to the

target box. In session 5, the initial box was 30 cm away from the target box, and this distance was increased to 60 cm in the sixth session, 75 cm in the seventh, 90 cm in the eighth, 120 in the ninth, and 140 cm in the tenth and eleventh. The sessions were defined as previously described[17], with sessions 1–3 considered the adjustment phase (the animal is exposed to a new environment and reward so that the natural neophobic behaviour disappears), sessions 4–6 as the pre-exposure phase (the animal is exposed to the target box and execution centre), sessions 7–9 as the learning-incentive or reinforcement phase (encouraged by the stimulus of reward), and sessions 10 and 11 as the fully trained phase (during which the animal confirms their learning by showing total familiarity with the tests and directly accessing the reward). The speed of task completion for each session was calculated by dividing the latency time taken to reach the target box by the length of the track. The speed in retrieving the reward indicates the animal's motivation. The rat was considered to have left the starting box when all four limbs were out of the box, and it was considered to have entered the target box when all four limbs were within the target box. Once the rat entered the target box and started eating, it could consume the palatable food for 30 s before being removed.

2.7 Taste reactivity testing

The test of reactivity to taste [19] was performed to study “liking”[20]. This test was performed when the rats(D15, n = 8, D30, n = 8) were 90 days old. The animal was placed in the arena (25 cm long × 25 cm deep × 20 cm front) with a transparent floor and walls with 1 mL sucrose solution at 30% or quinine solution ($C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl \cdot 2H_2O$; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) to 0.3 M in the left corner of the arena and directly on the floor [21]. A video camera (Sony Handycam DCR-DVD650 equipped with nightshot function; Sony, Tokyo, Japan) was placed under the transparent floor to record spontaneous facial and body reactions that occurred during and after voluntary sucrose or quinine intake. The animals were habituated to the testing arena for 2.5 min before the test. In each session, solutions were placed inside the arena, and the animals could drink the solution for 2.5 min while their behavior was filmed for later analysis. Animal reactions that were considered positive or hedonic included rhythmic protrusions of the tongue, lateral

protrusion of the tongue, and licking the paws. Negative or aversive reactions were yawning, shaking the head, cleaning the face, “shaking” with the front feet, and rubbing the chin. The tests of the two solutions were performed at least 48 h apart.

2.8 Statistical analysis

Data for the tail suspension test, taste reactivity test, palatable food intake after acute stress and palatable food intake are presented as the mean and standard deviation, and Student's *t*-tests were used to compare each group with its control. For analysis of body weight and runway analysis task incentive, we performed two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni tests to compare the effect of the low protein diet over the test days. In all evaluations, the level of significance was $p \leq 0.05$. All data were analyzed using GraphPad Prism 5 software, version 7 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

3. RESULTS

3.1 Body weight

There were no significant differences between the control group and early weaning group (figure 1).

3.2 Tail Suspension Test

The early weaning group (D15, $n = 8$, 138.3 ± 18.6 , $p < 0.001$) presented an increase in the immobility time when compared to the control group (D30; $n=8$, 70.6 ± 16.5 , $p < 0.001$) (figure 2)

3.3 Palatable food intake after acute stress

There were no significant differences between the control group and early weaning group (figure 3).

3.4 Palatable food intake

The absolute dietary intake of the early weaning group (D15, $n = 8$, 13.36 ± 1.56 , $p < 0.05$) was higher than the control group (D30; $n = 8$, 10.34 ± 2.70 , $p < 0.05$) (figure 4).

3.5 Runway task incentive

The early weaning group (D15; $n = 8$; 2.65 ± 0.97 , $p < 0.05$) in session 10 presented a lower speed when compared to the control group (D30; $n = 8$; 3.45 ± 0.5 , $p < 0.05$) (figure 5).

3.6 Taste reactivity testing

In the time of reactivity to sucrose, the early weaning group (D15; $n = 8$, 33.8 ± 9.3 , $p < 0.001$) had a shorter reaction time when compared to the control group (D30; $n = 8$, 64.1 ± 7.57 , $p < 0.001$). However, there is no difference in quinine reaction between the early weaning group (D15; $n = 8$, $23.3.8 \pm 8,0$, $p < 0.05$) and the control group (D30; $n = 8$; $31,4 \pm 9.07$, $p < 0.05$) (figure 6).

4. DISCUSSION

The rats submitted to early weaning did not present alterations in the palatable food intake after an acute alimentary stress. These data suggest that acute food stress is not enough to alter the consumption of palatable food in the short term.

In the tail suspension test (TST) early weaned animals increase the time of immobility against an inescapable situation. This result reinforces the idea that early weaning is associated with depression-like behavior.

In the Runway task incentive, the experimental group did not present persistent changes. In the taste reactivity testing, a shorter time of positive reactions to the hedonic substance (sucrose) was presented. However, the palatable food intake is significantly increased. Taken together these data suggest that early weaning does not persistently change patterns of wanting and learning but alters patterns of liking the food reward pathway.

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is the main regulatory pathway to respond to stress and in rodents its development occurs similar to the development of the regulatory pathways of food intake[22]. In the test that evaluated the intake of palatable food after acute stress the animal lost the ability to access the food for a short period but had access to visual and olfactory information. This test evaluates food consumption, without previous fasting, after a period of restriction with the aim of quantifying the palatable food intake only in response to food stress. The results found in this study may be associated with response pattern of the body to acute stress.

In acute stress there is a suppression of food intake that is mediated by corticotrophin releasing hormone (CRH) which acts by inhibiting the orexigenic peptides NPY (neuropeptide Y) and AGRP (agouti-related protein) in the arcuate nucleus of the hypothalamus.[23,24]. This feature is used by the body to prioritize fight and flight reactions. [25]. This may suggest that the short-term food intake data demonstrated in this paper may use this feature to mask deleterious effects on the neuroendocrine pathways responsible for behavioral responses to stressors and require a behavioral test that is related to fight and flight for demonstrate changes.

In the tail suspension test the rat is placed in hemodynamic stress of being hung in an inescapable situation and thus it is observed how much time passes in a immobility posture giving up escaping from an aversive situation [26]. These data are corroborated with the literature, both in humans and in laboratory animals, that associate depression-like behavior with stressful events in childhood [27,28]. In humans, 60% of cases of depression are preceded by exposure to stressors, especially those of maternal attachment, such as prolonged maternal deprivation [29]. Early weaning causes changes in the HPA axis, increasing levels of circulating glucocorticoids. [30]. This change also occurs in depression, findings show that there are dysfunctions of limbic structures, especially the hypothalamus and hippocampus, which present an increase in CRH secretion and a resistance to GR (causing an increase in circulating corticosterone). [31]. Thus, we may suggest that early weaning plays a critical role in the HPA axis that can result in a wide range of behavioral changes, including a predisposition depression-like behavior.

Individuals who have behavioral patterns associated with depression show greater preference and consumption of palatable foods as a way of relieving adverse feelings. [32]. The food reward system is associated with the psychological and neurobiological events that produce the conscious and unconscious sensation of pleasure in the individual. [9]. Our results demonstrate that the animal that was submitted to early weaning presents a phenotype of specific decrease in the time of positive reactions against palatable substances accompanied with an increase of the ingestion of palatable foods. The increase in food intake is corroborated by some data already published by our research group. These data demonstrate that early weaned animals present a preference for hypercaloric diets and an increase in the intake of palatable foods, in addition they present a delay in the satiety point[6,7].

Other studies with early weaning associate neonatal malnutrition submitted only by the absence of breast milk as a factor that induces metabolic alterations that demonstrate orexigenic patterns associated with the metabolic syndrome in adult life [33–35]. In an experiment with suppressed milk production by a prolactin inhibitor, an increased fiber density of neuropeptide Y (NPY), an important orexigenic peptide, has been demonstrated in adult life in the paraventricular and arcuate nuclei of the hypothalamus [33]. Another study evaluated animals that did not have access to breast milk, from the 18th to the 21st postnatal, through a mechanical barrier imposed by a bandage in the mammary glands [34]. These animals presented greater adiposity, insulin resistance and dyslipidemia in adulthood, patterns related to the development of obesity [34]. Our results about palatable food intake reaffirm that animals suffering from early weaning naturally tend to exhibit a pattern of increased intake of energy-rich foods.

Associated with increased food intake, animals that were early weaned had a lower reaction time to sucrose. This same pattern is found in experimental models of obesity and overweight whose diminished pleasure reactions are compensated in the increase of the energetic consumption to reach food reward patterns [36]. Studies indicate that early weaning is associated with obesity patterns in adulthood, this occurs because the body matures its eating behavior patterns so that it can store as much energy as possible into a nutrient-poor environment[3,37,38]. Thus, we can infer that animals submitted to early weaning present specific alterations in the pathways that coordinate the hedonic impact in the food reward system.

5. CONCLUSION

Early weaning is associated with depression-like behavior and promotes behavioral changes in the associated patterns in the "liking" mechanisms of hedonic food behavior. Therefore, it is worth mentioning that the results presented in this study demonstrate the importance of breastfeeding as a protective factor for the high consumption of energy-dense foods in adult life. As described in other studies, high food intake has been the main factor related to metabolic diseases.

6. CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the financial support FACEPE (Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco), CAPES and CNPq.

8. REFERENCES

- [1] N.J. Andreas, B. Kampmann, K. Mehring Le-Doare, Human breast milk: A review on its composition and bioactivity, *Early Hum. Dev.* 91 (2015) 629–635. doi:10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013.
- [2] S. Kojima, R.A. Stewart, G.E. Demas, J.R. Alberts, Maternal contact differentially modulates central and peripheral oxytocin in rat pups during a brief regime of mother-pup interaction that induces a filial huddling preference., *J. Neuroendocrinol.* 24 (2012) 831–40. doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02280.x.
- [3] L. Marseglia, S. Manti, G. D'Angelo, C. Cuppari, V. Salpietro, M. Filippelli, A. Trovato, E. Gitto, C. Salpietro, T. Arrigo, Obesity and breastfeeding: The strength of association, *Women and Birth.* (2015). doi:10.1016/j.wombi.2014.12.007.
- [4] C.G. Owen, R.M. Martin, P.H. Whincup, G.D. Smith, D.G. Cook, Effect of Infant

- Feeding on the Risk of Obesity Across the Life Course: A Quantitative Review of Published Evidence, *Pediatrics*. (2005). doi:10.1542/peds.2004-1176.
- [5] S. Gahagan, Development of eating behavior: Biology and context, *J. Dev. Behav. Pediatr.* (2012). doi:10.1097/DBP.0b013e31824a7baa.
 - [6] L. dos Santos Oliveira, D.P. de Lima, A.A.M. da Silva, M.C. da Silva, S.L. de Souza, R. Manhães-de-Castro, Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood, *Behav. Processes*. 86 (2011) 75–80. doi:10.1016/j.beproc.2010.09.005.
 - [7] L. dos S. Oliveira, L.P. da Silva, A.I. da Silva, C.P. Magalhães, S.L. de Souza, R.M. de Castro, Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats, *Behav. Processes*. (2011). doi:10.1016/j.beproc.2010.10.001.
 - [8] C. Erlanson-Albertsson, How palatable food disrupts appetite regulation, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97 (2005) 61–73. doi:10.1111/j.1742-7843.2005.pto_179.x.
 - [9] J.D. Salamone, M. Correa, The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine, *Neuron*. (2012). doi:10.1016/j.neuron.2012.10.021.
 - [10] D.J. Mela, Eating for pleasure or just wanting to eat? Reconsidering sensory hedonic responses as a driver of obesity, *Appetite*. 47 (2006) 10–17. doi:10.1016/j.appet.2006.02.006.
 - [11] N.E. Goeders, G.F. Guerin, Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration in rats, *Neuroendocrinology*. 64 (1996) 337–348. doi:10.1159/000127137.
 - [12] M.D. Britt, R.A. Wise, Ventral tegmental site of opiate reward: antagonism by a hydrophilic opiate receptor blocker, *Brain Res.* (1983). doi:10.1016/0006-8993(83)91232-5.
 - [13] L. Daoura, J. Haaker, I. Nylander, Early Environmental Factors Differentially Affect Voluntary Ethanol Consumption in Adolescent and Adult Male Rats, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* (2011). doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01367.x.
 - [14] T. Kikusui, S. Faccidomo, K.A. Miczek, Repeated maternal separation:

- Differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice, *Psychopharmacology (Berl)*. 178 (2005) 202–210. doi:10.1007/s00213-004-1989-1.
- [15] L. Steru, R. Chermat, B. Thierry, P. Simon, The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice, *Psychopharmacology (Berl)*. (1985). doi:10.1007/BF00428203.
- [16] J.A. de Souza, M.C. da Silva, R.J.B. de Matos, L.C. do Amaral Almeida, L.C. Beltrão, F.L. de Souza, R.M. de Castro, S.L. de Souza, 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*. (2018). doi:10.1016/j.appet.2017.12.004.
- [17] S. Pecina, B. Cagniard, K.C. Berridge, J.W. Aldridge, X. Zhuang, Hyperdopaminergic Mutant Mice Have Higher “ Wanting ” But Not “ Liking ” for Sweet Rewards, *J. Neurosci.* (2003). doi:10.1097/00008877-200409000-00094.
- [18] P.P. Silveira, A.K. Portella, S.A.C.N. Assis, F.B. Nieto, L.A. Diehl, L.M. Crema, W. Peres, G. Costa, C. Scorza, J.A. Quillfeldt, A.B. Lucion, C. Dalmaz, Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism, *Int. J. Dev. Neurosci.* (2010). doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.08.018.
- [19] H.J. Grill, R. Norgren, The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats., *Brain Res.* 143 (1978) 281–97.
- [20] K.C. Berridge, Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2000). doi:10.1016/S0149-7634(99)00072-X.
- [21] A.C. Shin, P.J. Pistell, C.B. Phifer, H.R. Berthoud, Reversible suppression of food reward behavior by chronic mu-opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens, *Neuroscience*. (2010). doi:10.1016/j.neuroscience.2010.07.017.
- [22] S. Entringer, P.D. Wadhwa, Developmental programming of obesity and

- metabolic dysfunction: role of prenatal stress and stress biology., Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser. (2013). doi:10.1159/000348454.
- [23] S.C. Heinrichs, F. Menzaghi, E.M. Pich, R.L. Hauger, G.F. Koob, Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y, *Brain Res.* (1993). doi:10.1016/0006-8993(93)91771-J.
 - [24] P.J. Currie, Integration of hypothalamic feeding and metabolic signals: Focus on neuropeptide Y, *Appetite.* (2003). doi:10.1016/j.appet.2003.08.011.
 - [25] L. Sominsky, S.J. Spencer, Eating behavior and stress: A pathway to obesity, *Front. Psychol.* (2014). doi:10.3389/fpsyg.2014.00434.
 - [26] J.F. Cryan, C. Mombereau, A. Vassout, The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2005). doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.
 - [27] P.T. Chan, S.N. Doan, M.C. Thompson, Stress generation in a developmental context: The role of youth depressive symptoms, maternal depression, the parent-child relationship, and family stress, *J. Fam. Psychol.* (2014). doi:10.1037/a0035277.
 - [28] J. Vetulani, Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition., *Pharmacol. Rep.* (2013). doi:10.1016/S1734-1140(13)71505-6.
 - [29] M.F. Juruena, An integrative science approach: Neuroscience in the DSM-V and ICD-11, *Acta Neuropsychiatr.* (2011). doi:10.1111/j.1601-5215.2011.00584.x.
 - [30] D. Liu, Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress, *Science* (80-.). (1997). doi:10.1126/science.277.5332.1659.
 - [31] C. Von Werne Baes, S.M. De Carvalho Tofoli, C.M.S. Martins, M.F. Juruena, Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: Glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress - A systematic review, *Acta Neuropsychiatr.* (2012). doi:10.1111/j.1601-

5215.2011.00610.x.

- [32] M. Macht, How emotions affect eating: A five-way model, *Appetite*. (2008). doi:10.1016/j.appet.2007.07.002.
- [33] V. Younes-Rapozo, E.G. Moura, A.C. Manhães, N. Peixoto-Silva, E. de Oliveira, P.C. Lisboa, Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring., *Br. J. Nutr.* (2015) 1–10. doi:10.1017/S0007114514003882.
- [34] N. Da Silva Lima, E. Gaspar De Moura, M. Cottini Fonseca Passos, J. Firmino Nogueira Neto, A.M. Reis, E. De Oliveira, P.C. Lisboa, Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring, *Br. J. Nutr.* (2011). doi:10.1017/S0007114510005064.
- [35] N. Peixoto-Silva, E.G. Moura, J.C. Carvalho, J.L. Nobre, F.T. Quitete, C.R. Pinheiro, A.P. Santos-Silva, E. de Oliveira, P.C. Lisboa, Bromocriptine treatment at the end of lactation prevents hyperphagia, higher visceral fat and liver triglycerides in early-weaned rats at adulthood, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (2017). doi:10.1111/1440-1681.12724.
- [36] F. Bellisle, A. Drewnowski, G.H. Anderson, M. Westerterp-Plantenga, C.K. Martin, Sweetness, Satiating, and Satiety, *J. Nutr.* (2012). doi:10.3945/jn.111.149583.
- [37] B. Koletzko, R. Von Kries, R.C. Monasterolo, J.E. Subías, S. Scaglioni, M. Giovannini, J. Beyer, H. Demmelmair, B. Anton, D. Gruszfeld, A. Dobrzanska, A. Sengier, J.P. Langhendries, M.F.R. Cachera, V. Grote, Infant feeding and later obesity risk, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2009. doi:10.1007/978-1-4020-9173-5_2.
- [38] T. Fukami, X. Sun, T. Li, M. Desai, M.G. Ross, Mechanism of programmed obesity in intrauterine fetal growth restricted offspring: paradoxically enhanced appetite stimulation in fed and fasting states., *Reprod. Sci.* 19 (2012) 423–30. doi:10.1177/1933719111424448.

Figures

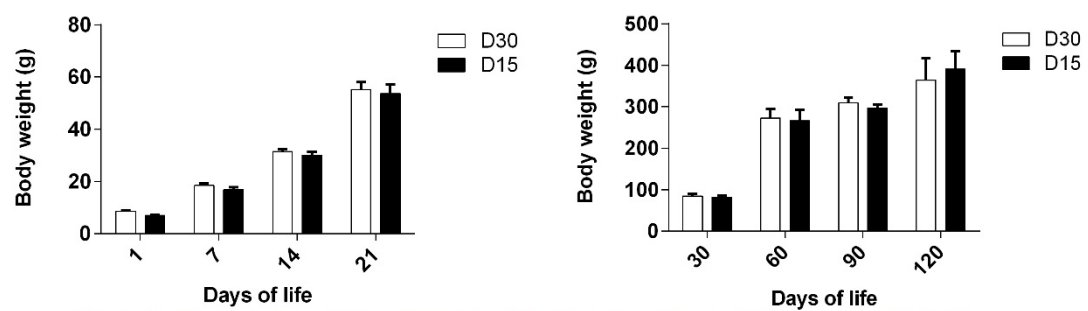


Fig. 1. Evaluation of body weight of rats submitted to early weaning. Two way ANOVA was used followed by Bonferroni test, $p < 0.05$. Data presented as mean $\pm$ SD. D30, $n = 8$; D15, $n = 8$.

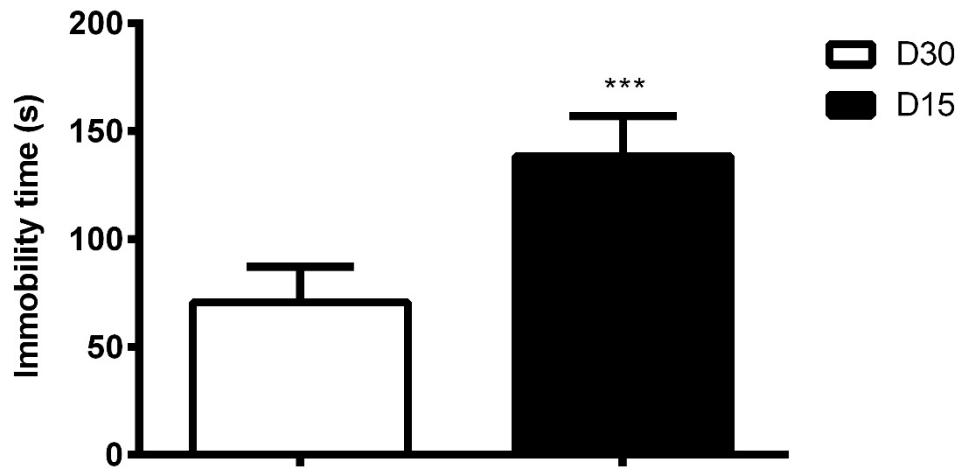


Fig. 2. Tail suspension test in rats submitted to early weaning. Student *t*-test was used, *** $p < 0.001$. The data were expressed as mean and SD. Groups: control (D30), $n = 8$; early weaning (D15), $n = 8$.

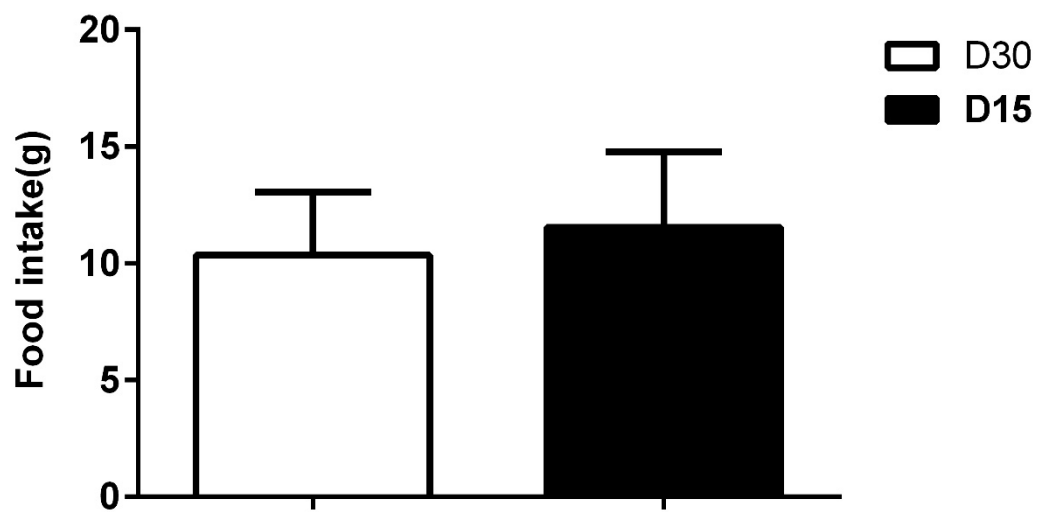


Fig. 3. Effect of the early weaning on palatable food intake after acute stress. Student *t*-test was used. The data were expressed as mean and SD, $p < 0.05$. Groups: control (D30), $n = 8$; early weaning (D15), $n = 8$.

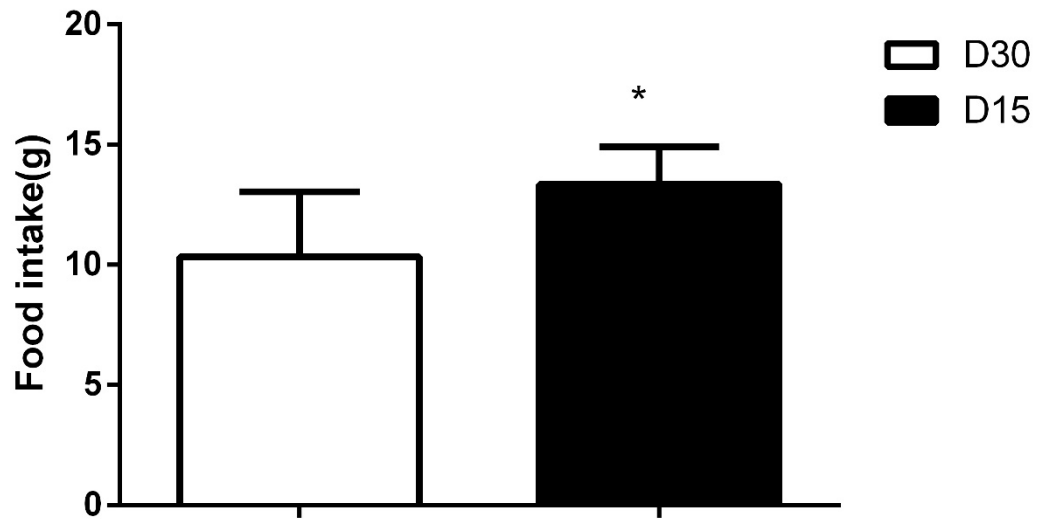


Fig. 4. Effect of the early weaning on palatable food intake. Student *t*-test was used. The data were expressed as mean and SD, * $p < 0.05$. Groups: control (D30), $n = 8$; early weaning (D15), $n = 8$.

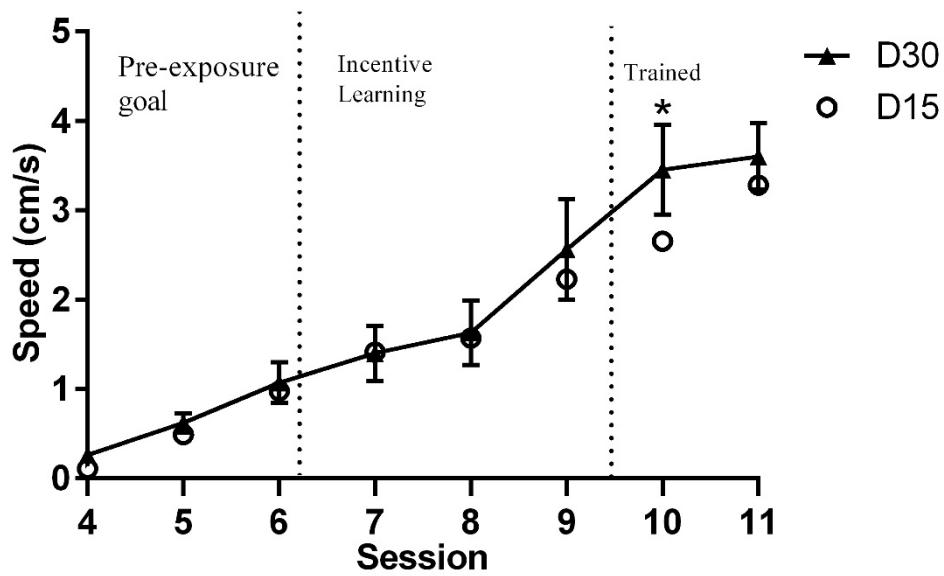


Fig. 5. Test food motivation in rats submitted to early weaning. Data presented as mean $\pm$ SD. Two way ANOVA was used followed by Bonferroni test, * $p < 0.05$. Groups: control (D30), $n = 9$; early weaning (D15), $n = 8$.

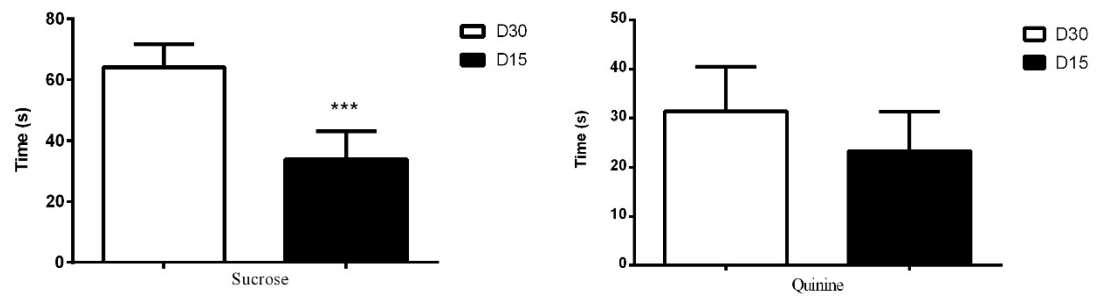


Fig. 6. Reactivity test the taste in rats submitted to early weaning. Student *t*-test was used, ****p* < 0.001. The data were expressed as mean and SD. Groups: control (D30), *n* = 8; early weaning (D15), *n* = 8.