



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

MAYARA MATIAS DE OLIVEIRA

**COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO E DESMAME PRECOCE:
BIOLOGIA DO SISTEMA NOCICEPTINA/ORFANINA FQ – RECEPTOR NOP**

RECIFE

2021

MAYARA MATIAS DE OLIVEIRA

**COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO E DESMAME PRECOCE:
BIOLOGIA DO SISTEMA NOCICEPTINA/ORFANINA FQ – RECEPTOR NOP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor (a) em Nutrição. Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

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

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

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48c Oliveira, Mayara Matias de.
Comportamento alimentar hedônico e desmame precoce: biologia do sistema Nociceptina/orfanina FQ – receptor NOP / Mayara Matias de Oliveira. – 2021.
69 f.: il.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2021.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Comportamento alimentar. 2. Sistema límbico. 3. Desmame precoce. 4. Nociceptina/orfanina FQ. 5. Receptor NOP. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2021-178)

MAYARA MATIAS DE OLIVEIRA

**COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDÔNICO E DESMAME PRECOCE:
BIOLOGIA DO SISTEMA NOCICEPTINA/ORFANINA FQ – RECEPTOR NOP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor (a) em Nutrição.
Área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovada em 22/06/2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra Taisy Cinthia Ferro Cavalcante
Universidade de Pernambuco

Prof. Dra Elizabeth do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Julliet Araújo de Souza
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Matilde Cesiana da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Rachel Krolow Santos Silva Bast
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**A minha mãe, Maria Alemberg.
A todas as vítimas do COVID-19.**

AGRADECIMENTOS

Agradecer, mostrar ou manifestar gratidão, render graças, reconhecer.

A conclusão deste trabalho se deu graças à contribuição de algumas mãos, e outros tantos ombros e ouvidos. Agradeço a todos que contribuíram nessa jornada, especialmente aos aqui citados.

A Deus, por sempre iluminar, guiar e proteger. Por colocar pessoas/anjos de luz em minha vida, com os quais eu aprendo constantemente sobre o infinito do ser e viver.

No meio do caminho tinha uma pedra.

Tinha um derrame no meio do caminho.

No meio do caminho tinha uma pandemia.

Tinha um câncer no meio do caminho.

Mas no meio do caminho também tinha Deus e dito isso, todos os caminhos se abriram.

A minha família, especialmente minha mãe, Maria, pelo exemplo de ser humano, pela garra, coragem, dedicação, abnegação e amor incondicional que me trouxeram até aqui e que levarão sempre além. Obrigada mãe, pai (Edson) e Paulo (irmão) pelo suporte por seu amor e paciência que permitiram aturar meus estresses e desesperos. Amo vocês com a certeza de que jamais encontrarei palavras ou gestos que sejam suficientes para demonstrar a magnitude deste sentimento.

A vida das minhas vidas, meu amor, inspiração, força e alegria: Alexsandro Marques. Jamais encontrarei palavras suficientes pra agradecer tudo o que você fez, faz e é na minha vida. Não há uma virgula aqui e nem nada na minha vida que não esteja repleta da luz que você traz. Obrigada pelo amor desmedido e irrestrito, companheirismo, cumplicidade, compreensão, apoio, incentivo, força, calma, bom humor e paciência infinita. Obrigada pela fé depositada, por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditei e ser meu ponto de equilíbrio quando desmoronei. Obrigada por me fazer sorrir mesmo nos piores dias. Obrigada por todos os dias me ensinar o verdadeiro significado e amor e felicidade. Amo você ao infinito e muito mais além! *“Take love, multiply it with infinity and take it to depths of forever and you still have only a glimpse of how I feel about you.”*

Aos meus falecidos avós Sônia e José, e meu padrasto Elvio, meu eterno agradecimento, sabendo que em vida talvez não tenha deixado claro o quanto seu

amor e suas lições e histórias fazem parte do que sou hoje. Guimarães Rosa uma vez disse que as pessoas que amamos não morrem, elas ficam encantadas; vocês ficaram encantados, mas também seguem encantando minha vida.

A minha orientadora Prof^a. Sandra Lopes. Obrigada Professora, pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada, por todas as orientações na pesquisa e na vida.

A minha co-orientadora Amanda Alves meus agradecimentos pelo apoio, suporte e amizade dentro e fora do laboratório, pelas conversas e almoços e telefonemas filosóficos que nunca serão esquecidos. Sua filosofia de trabalho e seus discursos sempre servirão de inspiração para mim. Obrigada por tudo, chefinha.

A Tatá, pela amizade e toda ajuda dada! Você e Amanda estarão sempre em meu coração. Terminei o doutorado com a certeza de que, desde a IC, tive mais que orientadoras e colegas de trabalho. Ganhei amigas de verdade, amo vocês.

As estagiárias Paula e Bruna, vocês fizeram essa trajetória mais divertida.

As professoras Taisy Cavalcante, Elizabeth Nascimento e Juliet Araujo. Agradeço pelas observações e críticas fortemente construtivas durante a qualificação.

A Keilla, Leonardo, Thassiany e Hellen, obrigada por me acolherem e fazerem da central de liberação um lugar leve mesmo em meio ao caos do COVID.

A minha dupla de muitas madrugadas, Simone Lisboa, pela compreensão, carinho e solicitude.

Agradeço a Pós-Graduação em Nutrição por me proporcionar a possibilidade de obter novos conhecimentos.

A FACEPE pela concessão da bolsa que financiou este projeto.

RESUMO

Mudanças ambientais e nutricionais durante a lactação estão associadas a alterações estruturais no desenvolvimento e alterações comportamentais em longo prazo. O controle hedônico do comportamento alimentar demonstrou-se especialmente susceptível a modificações desencadeadas pelo desmame precoce. A complexidade do comportamento alimentar hedônico é demonstrada através da interação de múltiplas regiões encefálicas que, por sua vez, são influenciadas por diversos receptores e vias de sinalização que orquestram esse comportamento. Estudos demonstram a importância do receptor da nociceptina (NOP) na modulação do impacto hedônico imediato e o efeito hiperfágico associado à superexpressão do neuropeptídeo opióide nociceptina (N/OFQ). Considerando essas informações, o presente projeto teve como objetivo investigar os efeitos do desmame precoce no sistema Nociceptina/Orfanina-FQ e sua repercussão no controle do comportamento alimentar hedônico, através do bloqueio do receptor NOP. Os grupos experimentais foram formados de acordo com o período do desmame: grupo desmame precoce (D15) e grupo controle (D30). Foram avaliados: peso corporal, consumo de dieta padrão e palatável, resposta ao alimento palatável após estresse agudo, preferência alimentar, motivação pela busca da recompensa alimentar, reatividade ao paladar frente à substância hedônica ou aversiva, consumo de alimento palatável frente à dose aguda do antagonista do receptor NOP. Animais desmamados precocemente apresentaram maior consumo de alimento palatável quando desafiados em situação de estresse. Embora esses animais tenham mostrado menor busca pelo alimento palatável, foi evidenciado maior preferência e aumento do consumo de cookies, em comparação aos animais controle. O antagonista do receptor NOP foi capaz de normalizar o consumo de alimento palatável em animais desmamados precocemente além de reduzir esse consumo no grupo controle. O bloqueio do receptor NOP diminuiu a ingestão alimentar palatável em animais controle e normaliza o padrão de consumo de alimento palatável ocasionado pelo desmame precoce.

Palavras-chave: Comportamento alimentar; Sistema límbico; Desmame precoce; Nociceptina/orfanina FQ; Receptor NOP.

ABSTRACT

Environmental and nutritional changes during lactation are associated with structural modifications in development and behavioral alterations in the long term. The hedonic control of eating behavior was especially susceptible to changes triggered by early weaning. The complexity of hedonic eating behavior is demonstrated through the interaction of multiple brain regions that, in turn, are influenced by several receptors and signaling pathways that orchestrate this behavior. Studies elucidate the relevance of the nociceptin opioid peptide receptor (NOP) in modulating the immediate hedonic impact and the hyperphagic effect associated with the overexpression of the nociceptin opioid neuropeptide (N/OFQ). In light of this information, the present project aimed to investigate the effects of early weaning on the Nociceptin / Orphanin-FQ system and its impact on the control of hedonic eating behavior, by blocking the NOP receptor. The experimental groups were set according to the weaning period: early weaning group (D15) and control group (D30). The following were evaluated: body weight, standard and palatable diet consumption, palatable food after acute stress response, food preference, seek food reward motivation, taste when compared to hedonic or aversive substances reactivity, palatable consumption food compared to the acute dose of the NOP receptor antagonist. Animals weaned early, showed higher palatable food consumption when challenged in a stressful situation. Although, these animals exposed a palatable food decrease search, there was greater preference and increased palatable food consumption, compared to control animals. The NOP receptor antagonist was able to normalize the palatable food consumption in animals weaned early, in addition to reducing this consumption in the control group. Blocking the NOP receptor decreases palatable food intake in control animals and normalizes the palatable food consumption pattern caused by early weaning.

Keywords: Nociceptin/orphanin FQ. NOP. Feeding behavior. Hedonic control. Early-weaning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do sistema de recompensa alimentar.	20
Figura 2 - Representação esquemática da relação entre as áreas encefálicas do sistema de recompensa e os princípios comportamentais do controle hedônico do comportamento alimentar.	21
Figura 3 - Representação esquemática da distribuição da nociceptina no sistema nervoso central do rato, determinado por imuno-histoquímica e hibridização <i>in situ</i> . (...)	24
Figura 4 - Diagrama cronológico de intervenções.	29
Figura 5 - Representação do aparato do teste <i>Runway Task Incentive</i> .	33
Figura 6 - Reações afetivas ao paladar: (a) reações positivas em resposta a sacarose ou outras substâncias palatáveis e (b) reações negativas em resposta ao quinino outras substâncias não palatáveis.	33
Figura 7 - <i>Tail pinch</i> .	34
Figura 8 - Teste de preferência alimentar.	35

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Evolução do peso corporal de machos submetidos ao desmame precoce. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM. D30, n = 29; D15, n = 29. 36
- Gráfico 2 – Efeito do desmame precoce no padrão de ingestão de alimentos, dieta padrão (Labine Presence®) aos (A) 60, (B) 90 e (C) 120 dias de vida. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM; D30, n = 17, D15, n = 16. 37
- Gráfico 3 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre o consumo de alimento palatável (cookies chocolate Bauducco®) aos 60 (A), 90 (B) e 120 (C) dias. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM; D30, n = 17, D15, n = 16. 39
- Gráfico 4 - Efeito do antagonista do receptor NOP na ingestão de *cookies* em machos submetidos à privação materna pelo desmame precoce (Kcal). Os dados foram representados como média \pm erro padrão. Os dados foram analisados com ANOVA de dois fatores. $*p < 0,0001$, efeito antagonista do receptor de NOP de comparação intragrupo na ingestão de alimentos palatáveis. D30, n = 7, D15, n = 5. 40
- Gráfico 5 – Efeito do desmame precoce em sobre a busca por recompensa alimentar. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM; D30, n = 15, D15, n = 15. 41
- Gráfico 6 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre a reatividade à sacarose. Foi utilizado o teste *t-Student*, $**p < 0,001$. Os dados foram expressos em média e erro padrão. Grupos: D30, n = 11, D15, n = 10. 42
- Gráfico 7 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre a reatividade ao quinino. Foi utilizado o teste *t-Student*, $***p < 0,001$. Os dados foram expressos 42

em média e erro padrão. Grupos: D30, n = 11, D15, n = 10.

Gráfico 8 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre consumo alimentar de alimento palatável e dieta padrão 30 minutos e 1 hora após estresse leve causado pelo *Tail pinch*. One-way ANOVA, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$. Dados apresentados como média \pm SEM; Grupos: D30 frootloops com pinça, n=15; D30 frootloops sem pinça, n=13; D30 labina sem pinça, n=13; D30 labina com pinça, n=15; D15 labina com pinça, n=14; D15 labina sem pinça, n=14; D15 frootloops com pinça, n=14; D15 frootloops sem pinça, n=14. 43

Gráfico 9 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre a preferência alimentar. One-way ANOVA, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$. Dados apresentados como média \pm SEM D30, n = 16, D15, n = 16. 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ppN/OFQ	-	Prepronociceptina
N/OFQ	-	Nociceptina/Orfanina - FQ
K ⁺	-	Potássio
Ca ²⁺	-	Cálcio
AMPc	-	3'5'-adenosina-monofosfato cíclico
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
HPA	-	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ARC	-	Núcleo hipotalâmico arqueado
PVN	-	Núcleo hipotalâmico paraventricular
VMN	-	Núcleo hipotalâmico dorsomedial
DMH	-	Núcleo hipotalâmico dorsomedial
LHA	-	Área hipotalâmica lateral
NPY	-	Neuropeptídeo Y
AgRP	-	Proteína relacionada ao gene agouti
POMC	-	Pró-ópio-melanocortina
CART	-	Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina
FQ	-	Orfanina
SNC	-	Sistema Nervoso Central
ICV	-	Intracérebroventricular
α-MSH	-	Hormônio estimulador de α - melanócitos
CEEA	-	Comissão de Ética em Experimentação Animal
UFPE	-	Universidade Federal de Pernambuco
CRF	-	Fator de liberação de corticofrina
ACTH	-	Hormônio adrenocorticotrófico
mRNA	-	RNA mensageiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	DESMAME PRECOCE.....	17
2.1.1	Desmame precoce e seu impacto no processo saúde-doença	18
2.2	CONTROLE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	19
2.2.1	Sistema nociceptina/orfanina FQ – receptor NOP e sua atuação no comportamento alimentar.....	23
3	HIPÓTESE.....	27
4	OBJETIVOS.....	28
4.1	OBJETIVO GERAL.....	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1	ANIMAIS.....	29
5.2	MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	29
5.3	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	29
5.4	CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL E DIETA PADRÃO.....	29
5.5	CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL FRENTE A MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA COM O ANTAGONISTA DO RECEPTOR NOP.....	29
5.6	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	30
5.6.1	<i>Runway Task Incentive</i>.....	30
5.6.2	Teste de Reatividade ao Paladar.....	31
5.6.3	<i>Tail pinch</i>.....	32
5.6.4	Teste de preferência alimentar.....	33
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
6	RESULTADOS.....	35
6.1	PESO CORPORAL.....	35
6.2	CONSUMO ALIMENTAR 60, 90 E 120 DIAS.....	35
6.3	CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL FRENTE A MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA COM O ANTAGONISTA DO RECEPTOR NOP.....	39

6.4	<i>RUNWAY TASK INCENTIVE</i>	40
6.5	TESTE DE REATIVIDADE AO PALADAR	41
6.6	<i>TAIL PINCH</i>	43
6.7	TESTE DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR.....	44
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA COM PARTICIPAÇÃO DA ALUNA DURANTE O DOUTORADO - UNDERNUTRITION DURING PREGNANCY AND LACTATION INCREASES THE NUMBER OF FOS-CELLS IN THE REWARD SYSTEM IN RESPONSE TO A 5-HT6 RECEPTOR AGONIST IN MALE ADOLESCENT RATS	64
	APÊNDICE B - PRODUÇÃO CIENTÍFICA COM PARTICIPAÇÃO DA ALUNA DURANTE O DOUTORADO - CO-OCCURRENCE OF DNMT3A, NPM1, FLT3 MUTATIONS IDENTIFIES A SUBSET OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH ADVERSE PROGNOSIS	65
	APÊNDICE C - PRODUÇÃO CIENTÍFICA COM PARTICIPAÇÃO DA ALUNA DURANTE O DOUTORADO - EFEITO DA MANIPULAÇÃO DE INIBIDOR SELETIVO DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA SOBRE O CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA E ATIVAÇÃO NEURONAL NO HIPOTÁLAMO DE RATAS ADULTAS	66
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	67
	ANEXO B - ARTIGO: MATERNAL DEPRIVATION BY EARLY WEANING CAUSES THE NOCICEPTIN TO ALTER THE PALATABILITY AND COOKIE CONSUMPTION	68
	ANEXO C - ARTIGO: THE FEED BEYOND NEED: MECHANISMS OF THE HEDONIC CONTROL OF EATING	69

1 INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, a mãe é a fonte nutricional da prole. No entanto, a relação complexa mãe-prole vai além do suprimento das necessidades nutricionais. A mãe provê estímulos essenciais térmicos, somatossensórios, olfatórios, visuais e auditivos durante parte do desenvolvimento pós-natal (CALDJI, DIORO, MEANEY, 2000). O ambiente produz impressões, tanto em animais quanto no ser humano, que influenciarão neurobiológica e psicologicamente a vida inteira (BARKER, 1995; KIKUSUI 2006). Fatores estressantes, incluindo a separação materna, produzem no animal comportamentos característicos de ansiedade e de desordem afetiva (SILVA, 2013). A presença de consequências imediatas, bem como os efeitos à longo prazo do desmame precoce em diversos comportamentos, ainda não foram bem caracterizados, particularmente nos padrões comportamentais e moleculares, do controle do comportamento alimentar (AGUGGIA, SUÁREZ, RIVAROLA, 2013).

Estudo do nosso grupo de pesquisa revelou que animais submetidos ao desmame precoce apresentam aumento no consumo de dieta rica em gordura, e aumenta a preferência por alimento palatável, indicando que o desmame precoce modifica componentes do controle hedônico do comportamento alimentar (OLIVEIRA et al., 2011). Nesse sentido, vale destacar o sistema opioidérgico que está amplamente distribuído na circuitaria neuronal envolvida nas diretrizes sensoriais, metabólicas e integrativas do comportamento alimentar (HAGHIGHI et al., 2014). Inserido nesse contexto, está o sistema nociceptina/orfanina FQ-receptor NOP, que vem chamando atenção pela sua contribuição nos processos de cognição, memória e dependência a drogas de abuso.

A prepronociceptina (ppN/OFQ) é um precursor proteico pertencente à família dos opióides que, a partir de clivagem enzimática, origina a nociceptina (N/OFQ) (WITKIN et al., 2014). A N/OFQ possui um receptor exclusivo, o receptor NOP. Tanto a N/OFQ, quanto seu precursor e seu receptor, possuem alta expressão no sistema nervoso central, especialmente no sistema límbico (KOOB, 2008). A presença da N/OFQ, particularmente, no córtex cerebral e em núcleos dopaminérgicos e serotoninérgicos, explica as várias ações centrais induzidas, tais como transmissão da dor, controle motor, resposta ao estresse, aprendizado, memória, dependência e recompensa às drogas de abuso e ingestão alimentar (WITKIN et al., 2014).

Nenhum ligante dos receptores opióides clássicos é capaz de se ligar ao receptor NOP, assim como a N/OFQ não se liga a nenhum outro receptor opioide (REINSCHEID et al., 1995). O receptor NOP é um receptor acoplado à proteína G do tipo inibitória, que ao ser ativado, aumenta o efluxo de potássio (K^+), reduz a entrada de cálcio (Ca^{+2}) e diminui a produção de 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc). Tais ações reduzem a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores, como a serotonina e noradrenalina (KOOB, 2008). Mesmo fazendo parte da família dos receptores opióides e tendo similaridade genética, transducional e estrutural, o receptor NOP difere, do ponto de vista farmacológico, dos receptores opióides clássicos (REINSCHEID et al., 1995).

Considerando as ações e particularidades do sistema N/OFQ - receptor NOP no controle límbico, é possível que sua manipulação possa gerar efeitos importantes que amenizem as limitações da terapia farmacológica para o tratamento da ansiedade, obesidade e compulsão alimentar disponível na atualidade, tornando-o um importante alvo terapêutico. Embora a relevância e a participação desse sistema em importantes aspectos comportamentais venham ganhando destaque, sua contribuição no controle hedônico do comportamento alimentar permanece obscura. Desse modo, o presente trabalho objetiva avaliar o efeito do bloqueio do sistema (N/OFQ) sobre o controle hedônico do comportamento alimentar em ratos desmamados precocemente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DESMAME PRECOCE

O desmame está entre os eventos mais importantes da fase inicial do desenvolvimento. A maturação dos padrões comportamentais está atrelada ao término do aleitamento (WEISSMAN et al., 2004). Durante essa fase, a interação da nutriz com seus filhotes tem grande importância para o desenvolvimento da sua prole, uma vez que processos básicos como limpeza, manutenção da temperatura corporal e a alimentação são fornecidos exclusivamente pela mãe (OLIVEIRA et al., 2011).

Em roedores, o processo de transição alimentar tem início por volta do 14º (décimo quarto) dia de vida, período em que os filhotes começam a experimentar os alimentos sólidos disponíveis no ambiente e a ingestão de leite diminui gradualmente até o desmame completo. A diminuição da resposta materna e da transferência de leite ocorre simultaneamente ao aumento da ingestão de alimentos sólidos (REDMAN, SWENEY, 1976). Desse modo, por volta da segunda semana é iniciado o desmame espontâneo que perdura até o 30º (trigésimo) dia de vida, onde o consumo de leite está completamente cessado e os filhotes alimentam-se inteiramente por alimentos sólidos (BABICKY et al., 1973; REDMAN, SWENEY, 1976).

Um indivíduo é considerado completamente desmamado a partir do momento em que não é mais alimentado por qualquer tipo de aleitamento (WEISSMAN et al., 2004). O desmame precoce é conceituado como a quebra da relação entre a nutriz e sua prole antes de um período considerado ótimo para aquisição de padrões maduros de desenvolvimento dos filhotes. Assim, findando o aleitamento materno e, conseqüentemente, o contato físico, ocorre a ruptura da proteção social fornecida pela mãe (SMITH et al., 2010; TOWNSEND, PITCHFORD, 2012). Nessa situação, o leite materno é excluído subitamente da alimentação do filhote e a alimentação sólida se torna a única fonte de nutrientes, sendo esse processo uma agressão nutricional. Além disso, o desmame ocasionado por separação materna impede os cuidados maternos para com o filhote, ocasionando também estresse emocional (KIKUSUI et al., 2005).

2.1.1 Desmame precoce e seu impacto no processo saúde-doença

Estudos sugerem forte associação entre injúrias ocorridas na vida fetal ou nas fases iniciais da vida pós-natal e o surgimento de doenças crônicas ao longo da vida (BARKER, 1995). Esses achados inferem a possibilidade de construção precoce de ajustes neurocomportamentais e metabólicos determinantes de morbidades ao longo da vida (LIMA et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), a desnutrição é uma das causas mais comuns de morbimortalidade infantil em todos os países. Altas taxas de desnutrição podem ocorrer devido à interrupção do aleitamento materno, que priva a criança de fatores nutricionais e hormonais, componentes essenciais para o desenvolvimento (VICTORA et al., 2016; OMS, 2018). A lactação é considerada um período crítico de desenvolvimento (BARKER, 1995). Por esse motivo, alterações nutricionais ou ambientais nessa fase podem afetar negativamente o indivíduo, levando à programação metabólica e conseqüente perfil neurobiológico alterado, favorecendo o aparecimento de doenças na vida adulta (ONG, GUES, 2018).

O desmame precoce, está associado a alterações neurocomportamentais persistentes (PATEL, SRINIVASAN, AALINKEEL, 2000; TOWNSEND, PITCHFORD, 2012). Animais desmamados precocemente apresentam comportamento ansioso. Quando submetidos a testes comportamentais ligados a ansiedade, tais como labirinto elevado em cruz e campo aberto, eles mostram um efeito duradouro do medo frente a acontecimentos e desafios quando submetidos a novos ambientes (KANARI et al., 2005).

O desmame precoce além de estar relacionado com essas alterações frente à situação de estresse, também afeta a cognição, a susceptibilidade ao abuso de droga, a memória, o aprendizado (KIKUSUI et al., 2006) e ainda ocasiona o aumento do comportamento ansioso (LU et al., 2000; CALDJI et al., 2004). Animais que sofreram desmame precoce apresentam uma hiperatividade, em longo prazo, do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (ITO et al., 2006; PISU et al., 2016). Isso é caracterizado pelo aumento dos níveis circulantes de glicocorticóides em repouso ou em resposta a agentes estressores leves (BERKSETH et al., 2014). O nível basal de corticosterona também se apresenta elevado quando comparado com animais que foram normalmente desmamados (ITO et al., 2006; PISU et al., 2016).

Ratos desmamados precocemente (14 dias) apresentam um aumento dos níveis de corticosterona até 48 horas após o desmame, enquanto os ratos que foram desmamados naturalmente retornam aos níveis basais de corticosterona já na primeira hora pós desmame (KIKUSUI et al., 2006). Esses achados sugerem que, além de alterações a longo prazo, o desmame precoce também resulta em repercussões imediatas.

O comportamento alimentar está especialmente susceptível a fatores ambientais no período de lactação, considerada etapa crítica da maturação de padrões neuro-hormonais da prole (GLUCKMAN, HANSON, 2004; MORGANE et al., 1993). Comer não é um comportamento simples. Alimentar-se requer um conjunto de tarefas a serem executadas pelo sistema nervoso central e periférico para coordenar o início da refeição, aquisição de alimentos, consumo dos alimentos adquiridos e término da refeição. A maioria dessas tarefas são comportamentos aprendidos durante e após o desmame (FERENCZI, 2010). Estudos demonstram que o período de amamentação é crítico para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta. O desmame precoce está associado ao retardo do ponto de saciedade, maior ganho de peso, hiperleptinemia, hiperfagia e hipertrofia dos adipócitos visceral e subcutâneo na vida adulta quando comparado a animais que foram naturalmente desmamados (OLIVEIRA et al., 2011; LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2017). Além disso, animais desmamados precocemente apresentam aumento no consumo de dieta rica em gordura e aumento da preferência por alimento palatável, indicando que o desmame precoce também modifica componentes do controle hedônico do comportamento alimentar (OLIVEIRA et al., 2011).

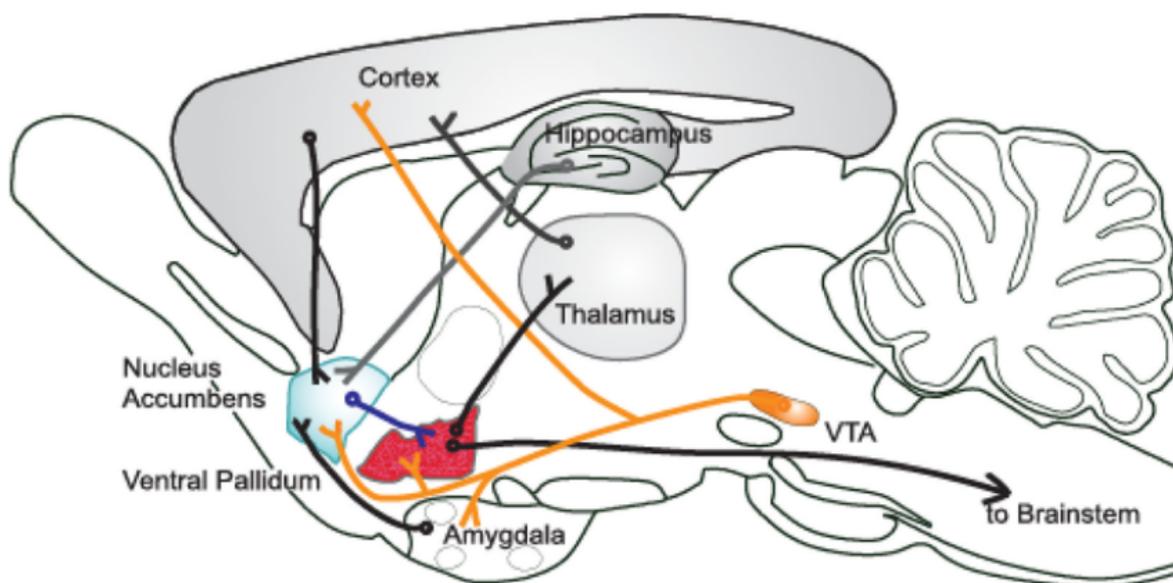
2.2 CONTROLE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O comportamento alimentar é resultado da interação de fatores fisiológicos, psicológicos, genéticos e das condições ambientais às quais o indivíduo é exposto desde o período fetal (RAMOS, 2000). Trata-se de um comportamento orquestrado pela complexa rede de conexões entre estruturas encefálicas e do trato gastrointestinal, além de estímulos sensoriais como o olfato, o paladar, a visão e propriedades inerentes ao alimento, como a textura e o sabor (MAGNI et al., 2009).

Diversos fatores influenciam o controle do comportamento alimentar, no entanto, esse pode ser caracterizado pelo sinergismo de dois tipos de mecanismos

complementares: a) homeostático, envolvendo os núcleos hipotalâmicos e o trato gastrointestinal; b) hedônico, coordenado pelo sistema de recompensa alimentar que inclui regiões encefálicas mesocorticolímbicas (Figura 1) (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

Figura 1 – Representação esquemática do sistema de recompensa alimentar.



Fonte: BERRIDGE, ALDRIDGE (2008).

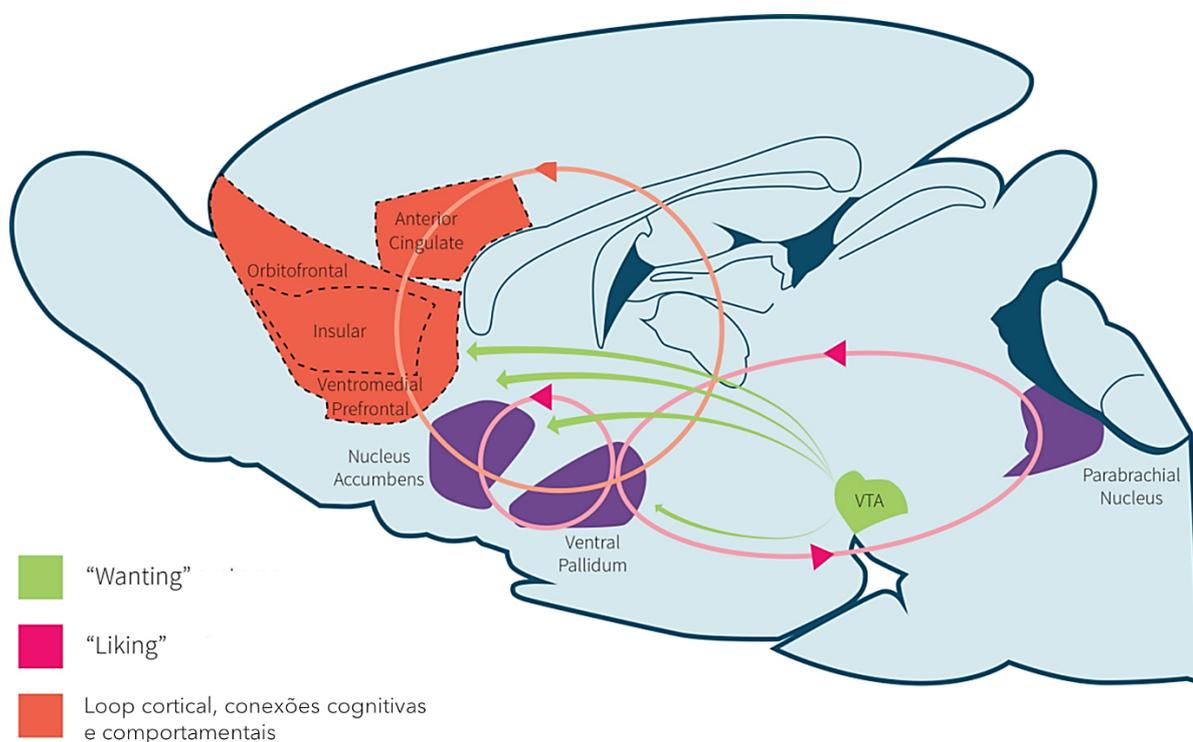
O hipotálamo integra aferências do trato gastrointestinal ao encéfalo para produzir sinais eferentes de controle da ingestão alimentar e do gasto energético. Os núcleos hipotalâmicos arqueado (ARC), paraventricular (PVN), ventromedial (VMN), dorsomedial (DMH) e área hipotalâmica lateral (LHA) estão envolvidos nessa regulação (SIMPSON et al., 2009). O ARC é integrador dos estímulos periféricos, neurais e sensoriais (BOURET, SIMERLY, 2006). Nesse núcleo são co-expressos o neuropeptídeo Y (NPY), a proteína relacionada ao gene agouti (AgRP), indutores do consumo alimentar, a pró-ópio-melanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (CART), indutores da saciedade (WYNNE et al., 2005).

As duas populações neuronais do núcleo arqueado são sensíveis a sinais liberados pelo trato gastrintestinal, pelo tecido adiposo (estoque de energia), e pelos níveis de nutrientes circulantes (BERTHOUD, MORRISON, 2008). Os núcleos paraventricular, dorsomedial e área hipotalâmica lateral contêm os neurônios de segunda ordem, responsáveis por assimilar as informações recebidas do arqueado,

da periferia e de outras regiões do encéfalo, e efetuar os ajustes em direção à homeostase energética (WYNNE et al., 2005).

O controle homeostático pode sofrer a influência de fatores estimulantes do controle hedônico, como o odor, sabor, textura, conteúdo de lipídios e açúcares simples e estímulos visuais do alimento (KELLEY, BERRIDGE, 2002). Assim, quando presentes no processo alimentar, esses fatores ativam o sistema de recompensa que poderá aumentar a duração de uma refeição, retardando a resposta do sistema homeostático e permitindo o consumo de maior quantidade de alimento. As vias hedônicas são estimuladas por alimentos palatáveis, ricos principalmente em lipídios e carboidratos (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). Três princípios norteiam o sistema de recompensa alimentar: o gostar (*liking*), o querer (*wanting*) e o aprender (*learning*) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática da relação entre as áreas encefálicas do sistema de recompensa e os princípios comportamentais do controle hedônico do comportamento alimentar.



Fonte: Modificado de BERRIDGE (2009).

O "aprender" está relacionado a experiências passadas, memória a longo prazo e processos de compulsão (BERRIDGE, KRINGELBACH, 2008). O aprendizado pode

contribuir para o desenvolvimento e manutenção da adição. O comportamento alimentar pode ser modificado por associação entre o aprendido e experiências gustatórias relacionadas ou não ao prazer (YAMAMOTO, 2006). A amígdala é a principal estrutura responsável pelo processamento da informação de aprendizado, por transformar o incentivo de valor do alimento em estímulo neural (BAXTER, MURRAY, 2002). Ela interage com o córtex pré-frontal, tornando o estímulo de recompensa em estímulos emocionais conscientes, e com o núcleo accumbens, sendo capaz de dirigir e modular comportamentos operacionais de reforço (LALUMIERE, 2014).

O “querer” está implicado no desejo de ingerir um determinado tipo de alimento, podendo ser um estímulo não-condicionado ou aprendido. Pode apresentar um período de “Incentivo Saliente”, que reflete um estímulo condicionado atribuído a algum elemento de motivação, gerando um estado compulsivo semelhante àquele induzido por drogas de abuso, tais como crack e cocaína (BERRIDGE, KRINGELBACH, 2008). Esse mecanismo não tem impacto hedônico ou de prazer, apenas reflete “o querer” sem necessariamente gostar da recompensa (BERRIDGE e KRINGELBACH, 2008).

O “gostar” é uma reação consciente relacionada com mecanismos cognitivos, cujo principal estímulo é o valor motivacional do paladar ou palatabilidade (LONEY, 2012). Um alimento palatável é prazeroso e estimula de forma positiva o sistema gustatório (YAMAMOTO, 2008). Por sua vez, a informação obtida por cada célula gustatória converge para o sistema nervoso central, onde serão gerados a percepção cognitiva e os aspectos emocionais da informação palatável (YAMAMOTO, 2006). A região, conhecida como *Hotspot Shell* do *Liking*, é o nucleus accumbens, onde ocorre a liberação de opióides e endocanabinóides, neurotransmissores associados ao aumento da palatabilidade dos alimentos.

Muitas das estruturas neurais envolvidas na adição por drogas de abuso, também estão envolvidas na recompensa alimentar. Entre o grande número de ações biológicas, o sistema opióide foi reconhecido por sua importante atuação no sistema de recompensa, onde está intimamente envolvido no fomento do comportamento compulsivo e de dependência, como auto-administração de agonistas opióides e de outras drogas de abuso, como nicotina e álcool (FERENCZI, 2010). Os antagonistas dos receptores opióides atenuam o consumo de drogas e o apetite por alimentos palatáveis. Estudos demonstraram que os antagonistas opióides, como a naloxona ou

a naltrexona, diminuem a ingestão de alimentos palatáveis, enquanto agonistas dos receptores opióides, como morfina ou análogos de encefalina, aumentam o consumo desse tipo de alimento (HOLTZMAN, 1979; LEVINE, GRACE, BILLINGTON, 1991; YEOMANS, GRAY, 2002). Administração aguda de morfina e outros medicamentos agonistas opióides gerais aumentam a ingestão de alimentos e o ganho de peso de maneira reversível após tratamento com naloxona (SHAW et al., 1991; FERENCZI, 2010). Em contraste, o tratamento crônico com morfina reduz a ingestão de alimentos e o peso corporal (FERENCZI, 2010). Tomados em conjunto, esses dados demonstram a existência de forte correlação entre as vias de opiáceos, homeostase do peso e ingestão alimentar, especialmente aqueles que são ditos gratificantes ou palatáveis. Essa relação aponta para a importância desse sistema de neurotransmissão no controle hedônico do comportamento alimentar, bem como a influência de sua disfunção na fisiopatologia da obesidade e de outras doenças associadas à alteração do peso corporal.

2.2.1 Sistema nociceptina/orfanina FQ – receptor NOP e sua atuação no comportamento alimentar

A N/OFQ é um peptídeo composto por 17 aminoácidos e que difere dos outros agonistas dos receptores opióides, por não possuir o resíduo de tirosina na porção N-terminal que é requerido para a atividade agonística dos receptores opióides μ , δ e κ (REINSCHEID et al., 1995). Embora a ausência desse resíduo de tirosina torne a N/OFQ incapaz de ligar-se aos receptores opioidérgicos clássicos, ela possui alta seletividade ao seu receptor específico, denominado de receptor NOP (MEUNIER et al., 1995; REINSCHEID et al., 1995).

Em 1995, Meunier et al. e Reinscheid et al. identificaram a N/OFQ simultaneamente. Aqueles isolaram esse neuropeptídeo e viram que ele estava relacionado à redução do limiar de dor, denominando-o N/OFQ. Estes, por sua vez, isolaram o ligante endógeno, denominando-o orfanina FQ (OFQ), em referência ao peptídeo com afinidade por um receptor que até então era considerado “órfão” e no qual o primeiro e o último aminoácido que compõe a cadeia peptídica são abreviados por F e Q (fenilalanina e glutamina, respectivamente). Na época da descoberta nenhum dos termos imperou, motivo pelo qual ficou conhecido como N/OFQ.

Após comprovação da interação com a N/OFQ, o receptor órfão, até então denominado como ORL1, foi intitulado receptor da N/OFQ (receptor NOP) (SNYDER, PASTERNAK, 2003). Embora faça parte dos receptores opióides, possuindo, inclusive, grande similaridade estrutural, o receptor NOP difere dos receptores opióides clássicos do ponto de vista farmacológico. Nem os opióides, nem os seus antagonistas se ligam com alta afinidade ao receptor NOP (MOGIL, PASTERNAK, 2001).

O NOP é um receptor acoplado à proteína G do tipo inibitória. Sua ativação causa redução da neurotransmissão e inibição do disparo neuronal através da diminuição do AMPc (HEINRICHER, 2003; SCHLICKER, MORARI, 2000). Ele está amplamente expresso no sistema nervoso central, sobretudo no córtex cerebral, hipocampo, núcleo olfatório, amígdala, núcleos talâmicos, além dos núcleos noradrenérgicos e serotonérgicos (*locus coeruleus* e o dorsal da rafe, respectivamente) (MOLLEREAU, MOULEDOUS, 2000).

Figura 3 - Representação esquemática da distribuição da nociceptina no sistema nervoso central do rato, determinado por imuno-histoquímica e hibridização *in situ*. Os corpos neuronais são mostrados como círculos sólidos e os terminais de fibra são mostrados como linhas curvas e curtas. AA, amígdala anterior; ABL, núcleo basolateral da amígdala; CA, comissura anterior; ACB, núcleo accumbens; ECA, núcleo central da amígdala; ACO, núcleo cortical da amígdala; AD, núcleo anterodorsal do tálamo; AL, lobo anterior da hipófise; AM, núcleo anteromedial do tálamo; AMB, núcleo ambíguo; AME, núcleo medial da amígdala; AON, núcleo olfativo anterior; ARC, núcleo arqueado; AV, núcleo anteroventral do tálamo; BST, núcleo do leite da estria terminal; CC, corpo caloso; CGX, córtex cingulado; CM, núcleo central-medial do tálamo; COCH, complexo nuclear coclear; CPU, caudado-putame; TSC, trato corticoespinal; DH, corno dorsal da medula espinhal; DG, giro dentado; DM, núcleo dorsomedial do hipotálamo; DNV, núcleo motor dorsal do vago; DTN, núcleo dorsal tegmental; ENT, córtex entorrinal; NF, núcleo fastigial do cerebelo; FRX, córtex frontal; GL, camada glomerular de bulbo olfativo; GP, globus pallidus; HM, núcleo habenular medial; HPC, hipocampo; CI, colículo inferior; IL, lobo intermediário da hipófise; PI, complexo nuclear interpeduncular; LC, núcleo locus coeruleus; LG, núcleo geniculado lateral; LHA, área hipotalâmica lateral; LRN,

Uma das características do sistema de neurotransmissão N/OFQ é que, tanto o receptor NOP, quanto a molécula em si (N/OFQ), estão expressos nas regiões encefálicas que compõem o sistema límbico. Essa co-expressão reforça a sugestão de que o sistema N/OFQ tem relevância na modulação de comportamentos coordenados pelo sistema límbico, tais como emoções, recompensa e regulação do eixo HPA (DARLAND, HEINRICHER, GRANDY, 1998).

Além de sua ampla distribuição no Sistema Nervoso Central (SNC) e sua participação no controle de uma variedade das funções biológicas, também foi demonstrado o envolvimento do sistema N/OFQ – receptor NOP, na fisiopatologia de alguns transtornos neurológicos, no desenvolvimento de tolerância aos opioides, no abuso de substâncias e no comportamento alimentar (TOLL et al., 2016).

Evidências apontam para a participação do sistema N/OFQ no controle da ingestão de alimentos em roedores, exercendo um efeito orexígeno (POLIDORI, DE CARO, MASSI, 2000; WITKIN et al., 2014). A administração intracerebroventricular (ICV) de N/OFQ, em ratos, foi capaz de promover aumento do consumo alimentar desses animais (POLIDORI, DE CARO, MASSI, 2000). Bewick et al. (2005), mostraram que o tratamento com N/OFQ estimula um aumento de AgRP e diminuição na liberação do CART. Sabe-se que o AgRP é um peptídeo orexigênico que compete com o hormônio estimulador de α -melanócitos (α -MSH) pelos receptores de melanocortina, enquanto o CART exerce um efeito inibitório na ingestão alimentar (KALRA et al., 1999). Statnick et al. (2016) demonstraram que a administração de um antagonista NOP (LY2940094) foi capaz de reduzir o consumo alimentar e o ganho de peso em roedores. Nesse contexto, os antagonistas do receptor NOP seriam possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da ansiedade, obesidade e compulsão alimentar.

3 HIPÓTESE

O sistema Nociceptina/Orfanina- FQ encontra-se hiperestimulado em animais submetidos ao desmame precoce, desencadeando alterações no comportamento alimentar hedônico.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar, através do bloqueio do receptor NOP, os efeitos do desmame precoce no sistema Nociceptina/Orfanina-FQ e sua repercussão sobre o comportamento alimentar hedônico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em animais controle e submetidos a desmame precoce:

- Peso corporal;
- O consumo 24h de dieta padrão;
- O consumo 24h de alimento palatável na vida adulta;
- Resposta ao alimento palatável após estresse agudo;
- A preferência alimentar;
- A motivação pela busca da recompensa alimentar;
- A reatividade ao paladar frente à substância hedônica ou aversiva;
- O consumo de alimento palatável frente à dose aguda do antagonista do receptor NOP;

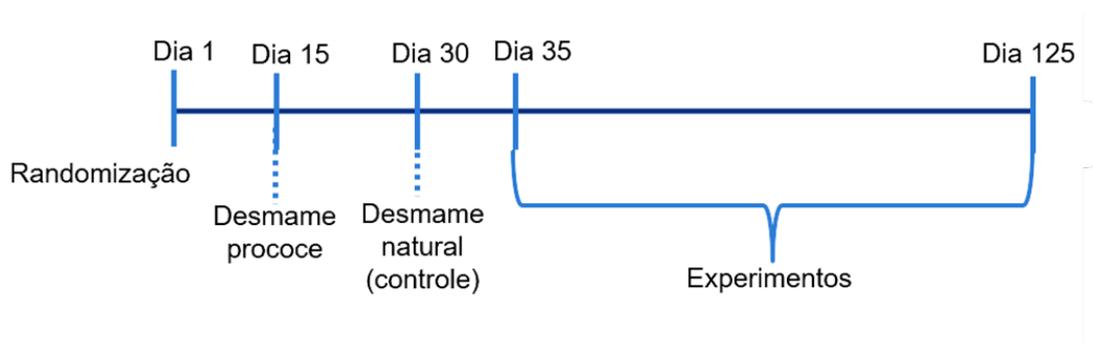
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Todos os experimentos receberam aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), processo nº 0030/2017 (Anexo I). Foram utilizadas ratas albinas (200-250g de peso corporal) da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da UFPE. As ratas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para 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 onde, durante a gestação e lactação receberam dietas padrão de biotério (Labina, *Presence*®). Um dia após o nascimento, todos os filhotes nascidos no mesmo dia foram randomizados e separados apenas os filhotes machos com 6-8g de peso. Após a sexagem, os filhotes machos foram distribuídos na proporção de 8 filhotes por mãe. Os grupos experimentais foram delineados de acordo com o período do desmame por separação da mãe em: grupo desmamado no 15º dia (D15) e grupo desmamado no 30º dia (D30) (Figura 4). Os testes comportamentais foram realizados entre 35 e 125 dias de vida dos animais (Figura 4).

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*.

Figura 4 - Diagrama cronológico de intervenções.



Fonte: a autora (2021).

5.2 MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA

Para investigar a atuação do sistema N/OFQ, foi utilizado o antagonista do receptor NOP, SB-612111 (SB-612111 *hydrochloride*) *Sigma-Aldrich*, EUA. A droga foi dissolvida e diluída em solução salina estéril a 0,9% e aplicada no volume de 10 ml/kg, dose aguda de 10mg/Kg, por via intraperitoneal, 30 minutos antes da perfusão para remoção dos encéfalos (HARDAWAY, 2016).

Após o desmame precoce, os animais pertencentes ao grupo D15 e D30 receberam alimento palatável (*cookies* chocolate *Bauducco*®) e foram randomicamente divididos em dois subgrupos de acordo com a aplicação do antagonista do receptor NOP ou da solução salina que receberam aos 35 dias.

5.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

O peso corporal foi aferido nos dias 0, 15, 30, 60, 90 e 120 pós-natal. Para as medidas de peso corporal foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000).

5.4 CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL E DIETA PADRÃO

O consumo de alimento palatável e o consumo de dieta padrão de biotério por 24 horas foi realizado em animais com 60, 90 e 120 dias de vida. As medidas de consumo foram tomadas através da diferença entre a *quota* oferecida (g) de *cookies* *Bauducco*® ou ração padrão de biotério e a *quota* rejeitada (g) do mesmo, após 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24 horas. Os grupos experimentais foram formados de acordo com o período do desmame de cada ninhada: D15 e D30.

5.5 CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL FRENTE A MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA COM O ANTAGONISTA DO RECEPTOR NOP

Nessa análise, foram utilizados animais aos 35 dias de vida. Os animais receberam SB-612111 (10mg/kg de peso corporal) ou solução salina (NaCl 0,9%) no volume de 10 ml/kg e dose aguda de 10mg/Kg, por via intraperitoneal. Trinta minutos após as injeções, foi disponibilizado alimento palatável (*cookies* chocolate

Bauducco®), em quantidade conhecida. Após trinta minutos da oferta, o alimento foi removido e pesado para obtenção do consumo por diferença entre a quantidade oferecida e a rejeitada.

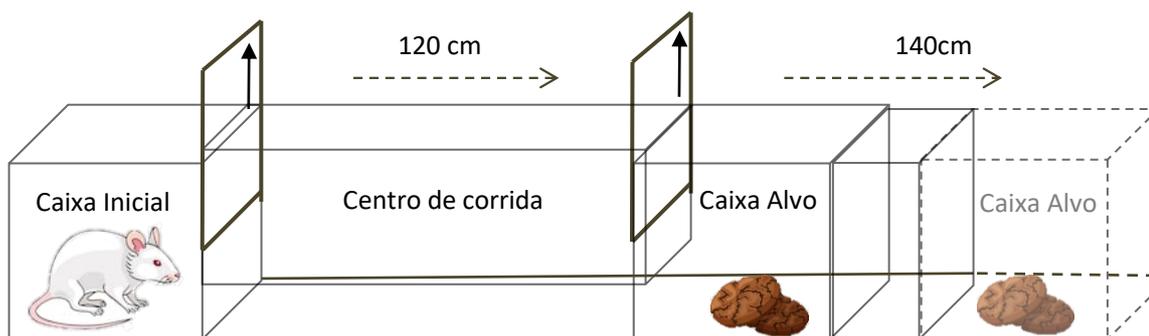
5.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

5.6.1 Runway Task Incentive

Aos 60 dias de vida, os animais foram submetidos ao *Runway Task Incentive* para estudo do “*Learning*” e do “*Wanting*” (PECINA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2004; SILVA et al., 2013), após privação alimentar de 4 horas. Esse teste consiste em um paradigma comportamental, o qual gera curvas de aquisição de aprendizado, bem como a velocidade e trajetória percorridas que expressam a motivação do animal frente ao estímulo da recompensa. O teste foi realizado entre 12h-14h, com os grupos D30 e D15.

A estrutura do *runway* foi composta por um corredor (polipropileno, 140×14×30cm) com duas caixas, uma inicial e outra alvo (acrílico 19×14×30 cm), localizadas em extremidades opostas (Figura 5). A distância entre as caixas variou a depender das sessões do teste.

Figura 5 - Representação do aparato do teste *Runway Task Incentive*.



Fonte: Adaptado de Silva (2014).

Os treinos foram conduzidos durante 11 sessões em dias alternados (22 dias), tendo cada sessão teve duração de 5 min. Nas três primeiras sessões os ratos foram colocados diretamente na caixa alvo (com as portas fechadas) durante 5 min, com acesso à recompensa (*cookies* chocolate *Bauducco*®). Os animais foram adaptados

aos *cookies* chocolate (*Bauducco*®) nas 3 primeiras sessões. Na 4ª sessão do treino, a caixa inicial foi localizada a 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 pode prosseguir pelo centro de corrida. Se o animal não saísse da caixa inicial em 3 min, ele era gentilmente movido para a caixa alvo. Na 5ª sessão, a caixa inicial se afastou 30 cm da caixa alvo; na 6ª sessão, 60 cm; 75 cm na 7ª sessão; 90 cm na 8ª sessão; 120 cm na 9ª sessão; e 140 cm nas 10ª e 11ª sessões. A tarefa completa foi calculada por cada sessão, dividida pelo tempo de latência de reação à caixa alvo e pelo comprimento de cada dia. A saída da caixa inicial e a entrada na caixa alvo foram registradas quando as 4 patas do animal se encontravam dentro dos compartimentos. O teste foi finalizado quando o animal entrou na caixa alvo e iniciou o consumo da recompensa em 30 segundos. Foram avaliados:

- Tempo de latência para sair da caixa inicial;
- Tempo de latência para reagir à caixa alvo;
- Número de pausas durante a corrida;
- Número de direção reversa na rota da corrida até o alvo (incluindo retração dos passos, acompanhado de comportamento exploratório- cheirar);
- Tempo de latência para iniciar o consumo da recompensa.

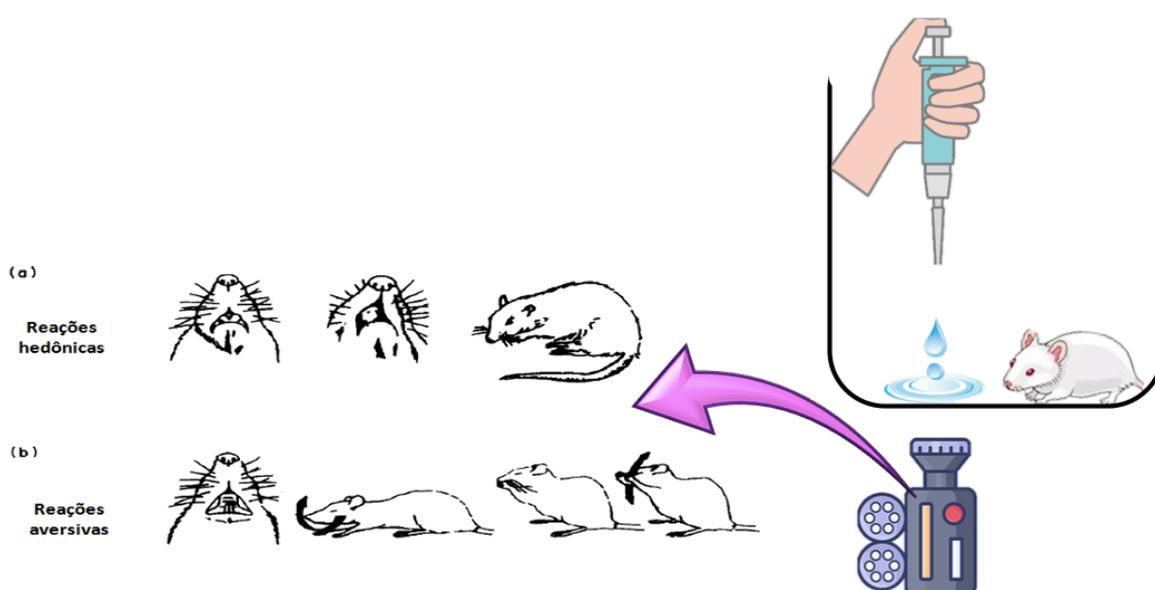
5.6.2 Teste de Reatividade ao Paladar

O teste de reatividade ao paladar de Grill e Norgren (1978), foi realizado para estudo do “*Liking*”. Esse teste foi realizado aos 90 dias de vida dos animais.

Para realização desse teste, o animal foi colocado numa arena (25cm altura x 25cm frente x 20cm fundo), com 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 (SHIN *et al.*, 2010). Uma câmera de vídeo (*Sony Handycam DCR-DVD650*, com função *nightshot*) 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 de seu início. Em cada teste, as soluções de sacarose ou de quinino foram colocadas no interior da arena e os animais liberados para ingerir as soluções por 2,5 minutos,

durante os quais 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 lambe as patas; e como reações negativas ou aversivas: bocejo, remexer a cabeça, limpar o rosto, “abanar” com as patas anteriores, esfregar o queixo (Figura 6). As análises entre um tipo de solução e outra foram realizadas com intervalo mínimo de 48h.

Figura 6 - Reações afetivas ao paladar: (a) reações positivas em resposta a sacarose ou outras substâncias palatáveis e (b) reações negativas em resposta ao quinino ou outras substâncias não palatáveis.



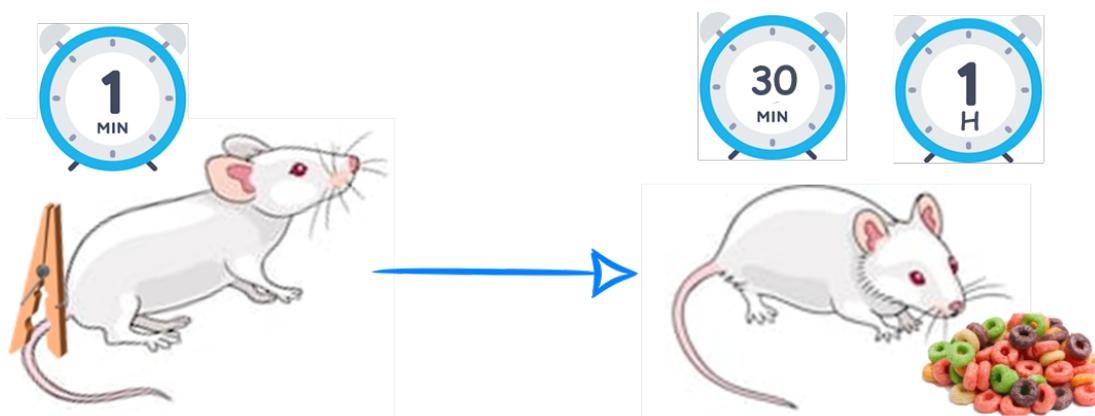
Fonte: Adaptado Grill e Norgren (1978)

5.6.3 Tail pinch

O *Tail pinch* ou pinçamento de cauda é um teste no qual se avalia a resposta alimentar induzida por uma situação de estresse leve, e breve, que consiste em pinçar a região localizada a cerca de 1cm da base da cauda do rato, com um prendedor de roupa feito de madeira. Estudos demonstram que a partir desse estresse ocorre uma ativação das vias mesolímbicas, com liberação de dopamina no núcleo accumbens (BRAKE et al., 2004), estando associado à indução de comportamento estereotipado e alimentação (SAMARGHANDIAN et al., 2003).

Para realização desse teste, a região foi pressionada por 1 min (D30P; D15P), medindo-se o consumo de alimento palatável (*Froot loops*®) e alimento padrão de biotério (Labina, *Presence*®), por um período de 1h, onde o consumo foi mensurado nos tempos 30 minutos e 1 hora (Figura 7). Para efeito de comparação, o grupo de animais não exposto ao pinçamento (D30SP; D15SP) foi submetido apenas a uma breve manipulação, que consistiu em tocar a cauda do animal por alguns segundos. O intervalo entre os testes foi de 72h.

Figura 7 - Tail pinch.

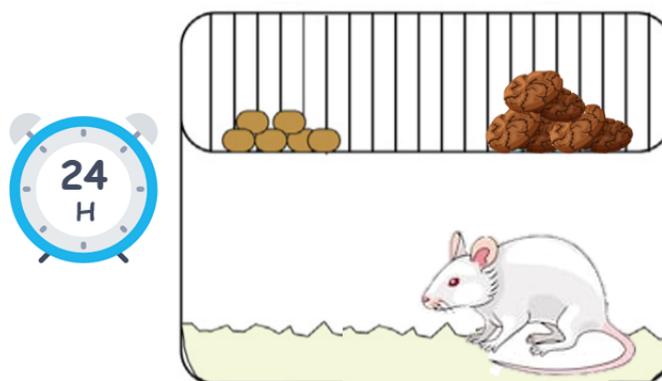


Fonte: a autora (2021).

5.6.4 Teste de preferência alimentar

Aos 120 dias, foi realizado o teste de preferência alimentar. Para a medida de preferência alimentar, comparou-se o consumo de alimento palatável (*cookies Bauducco*®) em relação ao consumo de dieta padrão (Labina, *Presence*®), ofertando ao mesmo tempo os dois alimentos por um período de 24h (Figura 8).

Figura 8 - Teste de preferência alimentar.



Fonte: a autora (2021).

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

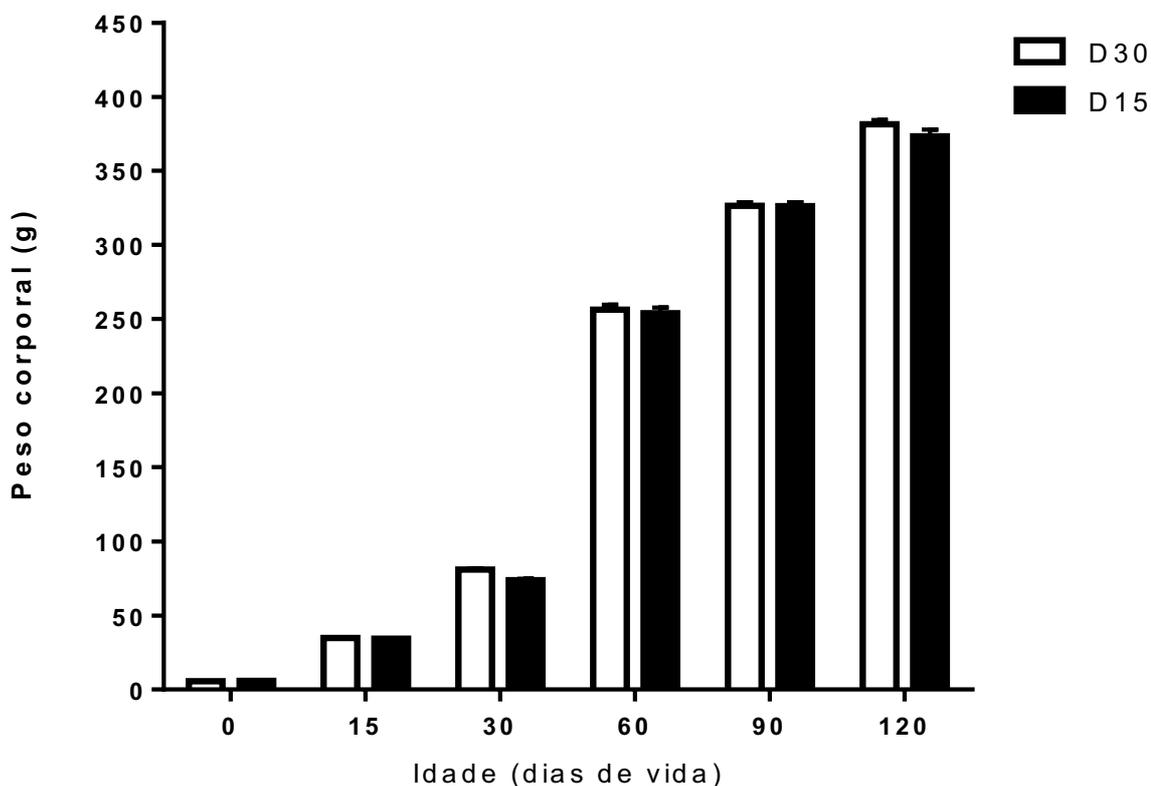
A análise estatística foi realizada de forma descritiva com o auxílio do GraphPad Prism 5, versão 7. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). Nas comparações dos diferentes grupos, empregou-se o ANOVA *Two Way* ou Teste t *Student* com diferença significativa ($p < 0,05$). Quando o ANOVA revelou diferença significativa, utilizou-se o teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPORAL

A avaliação do peso corporal nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120 dias não apresentou diferenças estatísticas nos grupos analisados D15 (n = 29) e D30 (n = 29). Não houve influência do desmame precoce ($F_{(1,336)} = 4.498$, $p = 0.0347$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Evolução do peso corporal de machos submetidos ao desmame precoce. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM. D30, n = 29; D15, n = 29.



Fonte: a autora (2021).

6.2 CONSUMO ALIMENTAR 60, 90 E 120 DIAS

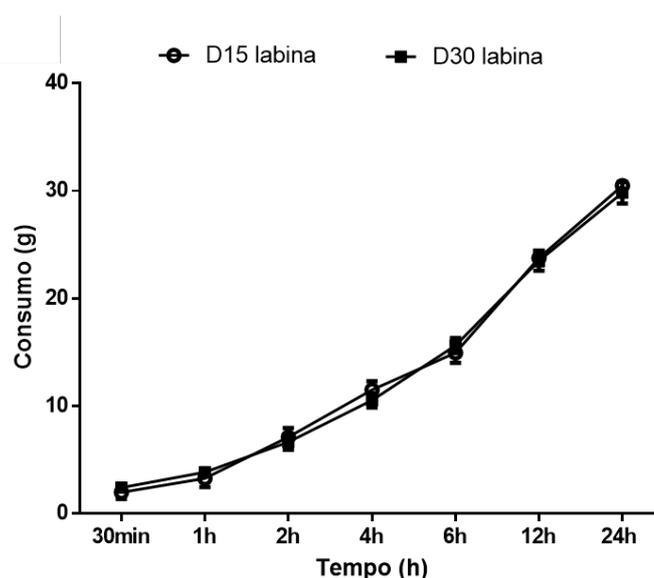
O teste de consumo alimentar não mostrou diferença no consumo de dieta padrão (Labina, *Presence*®) entre os grupos (D15, n=16; D30, n=17) em nenhuma

das idades avaliadas; 60 ($F_{(1,161)} = 0.0458$, $p = 0.8308$); 90 ($F_{(1,203)} = 8,754$, $p = 0.9432$), 120 dias ($F_{(1,203)} = 0.3495$, $p = 0.5551$) (Gráfico 2).

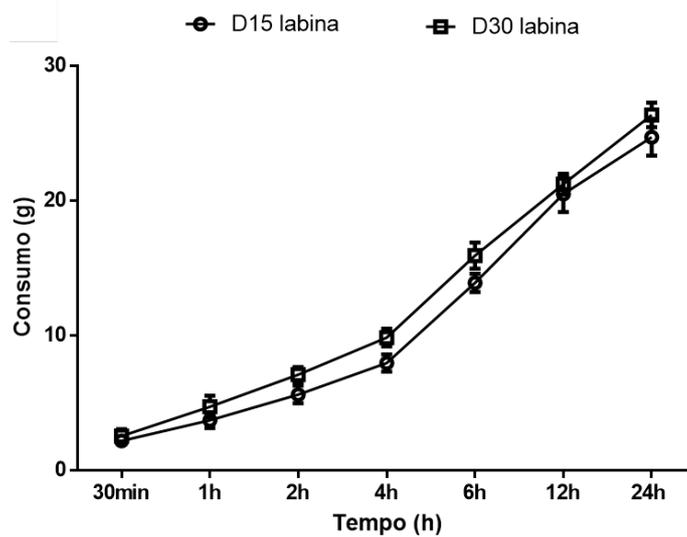
A respeito do consumo de alimento palatável (cookies chocolate *Bauducco*®), foi observado que o grupo desmame ($n=16$) consumiu mais cookie em comparação ao grupo controle ($n=17$) em todos os tempos na idade 60 dias ($F_{(1,217)} = 116.1$, $p < 0.0001$) (Gráfico 3A) ((30min: D15 = 5.88 ± 0.58 ; D30 = 2.19 ± 0.43 ; $p < 0.0001$), (1h: D15 = 9.37 ± 0.72 ; D30 = 4.17 ± 0.60), (2h: D15 = 13.33 ± 0.80 ; D30 = 7.49 ± 0.84 ; $p < 0.0001$), (4h: D15 = 17.80 ± 0.87 ; D30 = 12.23 ± 1.97 ; $p < 0.0001$), (6h: D15 = 22.40 ± 1.07 ; D30 = 15.32 ± 1.10 ; $p < 0.0001$), (12h: D15 = 27.08 ± 0.92 ; D30 = 19.50 ± 1.45 $p < 0.0001$), (24h: D15 = 37.30 ± 0.67 ; D30 = 33.11 ± 1.66 ; $p < 0, 0001$)). Aos 90 dias ($F_{(1,203)} = 0.2618$, $p = 0.6095$) foi significativo apenas no consumo de 24 horas (D15 = 38.67 ± 1.11 ; D30 = 33.72 ± 1.24 ; $p < 0.0001$) (Gráfico 3B). O mesmo comportamento não foi observado aos 120 dias, onde não houve significância em nenhum dos intervalos analisados ($F_{(1,203)} = 0.6991$, $p = 0.4041$) (Gráfico 3C).

Gráfico 2 – Efeito do desmame precoce no padrão de ingestão de alimentos, dieta padrão (Labine Presence®) aos (A) 60, (B) 90 e (C) 120 dias de vida. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM; D30, $n = 17$, D15, $n = 16$.

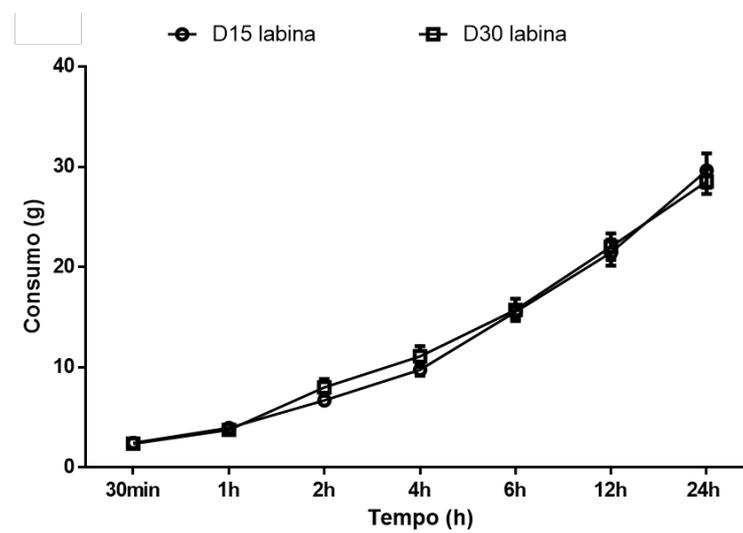
A)



B)

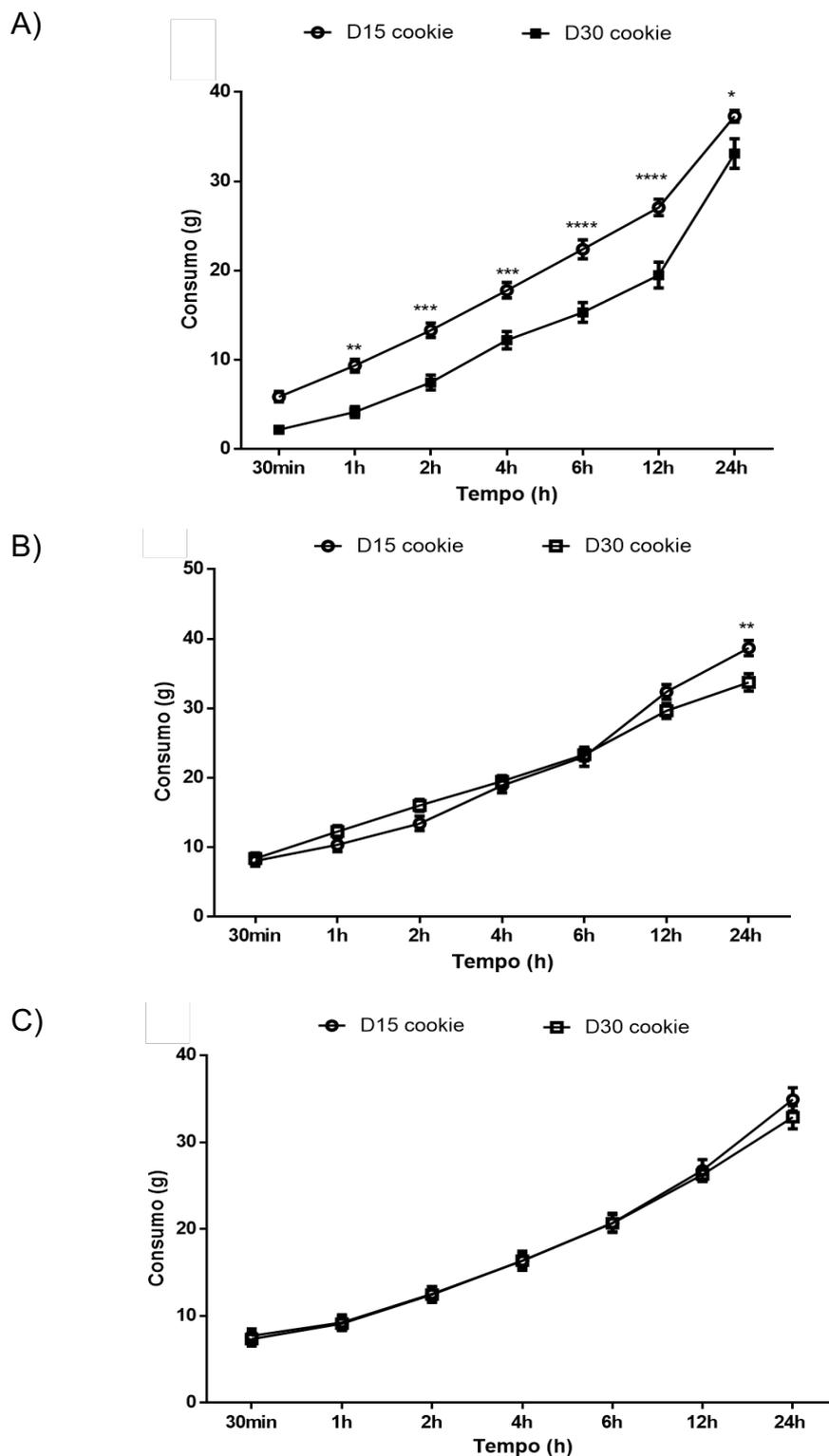


C)



Fonte: a autora (2021).

Gráfico 3 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre o consumo de alimento palatável (cookies chocolate Bauducco®) aos 60 (A), 90 (B) e 120 (C) dias. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM; D30, n = 17, D15, n = 16.

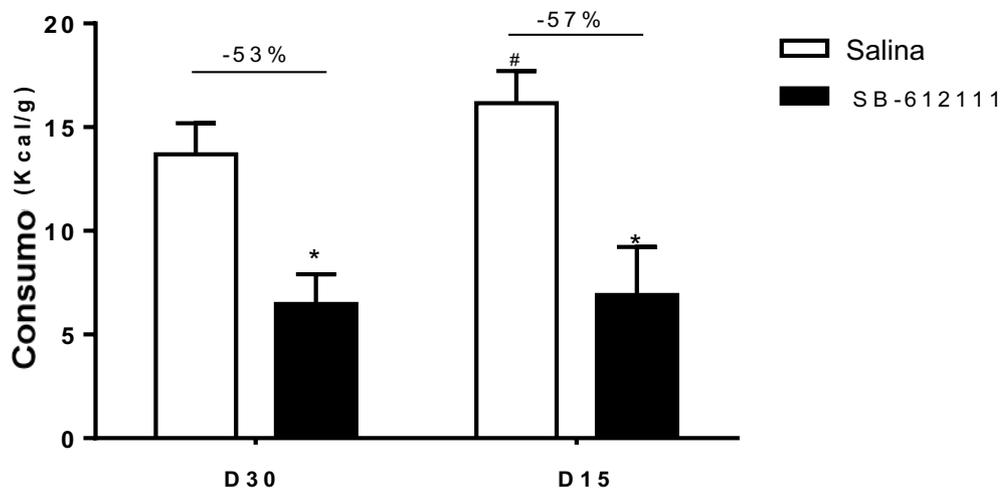


Fonte: a autora (2021).

6.3 CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL FRENTE À MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA COM O ANTAGONISTA DO RECEPTOR NOP

O bloqueio do receptor NOP promoveu redução do consumo de alimento palatável tanto no grupo controle (D30-Salina= 13,69 ± 1,50, n=7; D30 SB-612111= 6,47 ± 1,44, n=5;) quanto no grupo desmame precoce (D15-Salina= 16,16 ± 1,54, n=7; D15 SB-612111= 6,90 ± 2,32, n=5) ($F_{(1,20)} = 23.53, p < 0.0001$). O antagonista do receptor NOP reduziu 53% do consumo de *cookies* no grupo controle e 57% nos animais submetidos ao desmame precoce (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Efeito do antagonista do receptor NOP na ingestão de *cookies* em machos submetidos à privação materna pelo desmame precoce (Kcal). Os dados foram representados como média ± erro padrão. Os dados foram analisados com ANOVA de dois fatores. * $p < 0,0001$, # $p < 0,001$ efeito antagonista do receptor de NOP de comparação intragrupo na ingestão de alimentos palatáveis. D30, n = 7, D15, n = 5.



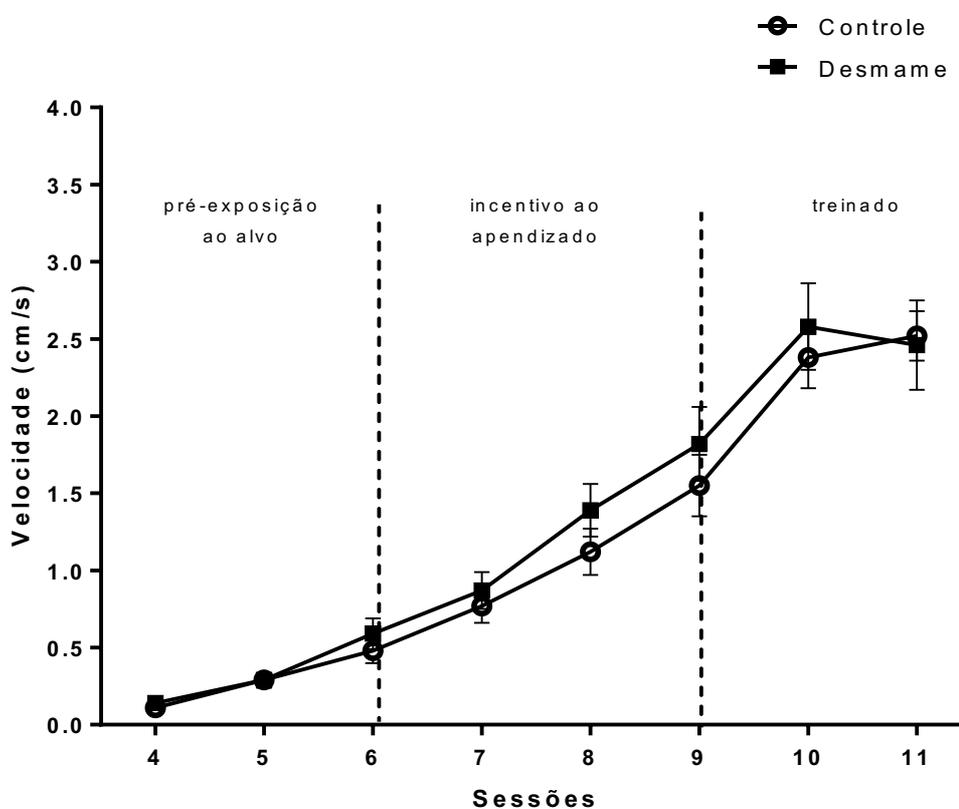
Fonte: a autora (2021).

6.4 RUNWAY TASK INCENTIVE

Não foram observadas diferenças na busca pelo alimento palatável (*wanting*) no grupo desmamado ($F_{(1,222)} = 2.027, p = 0.1560$) (Pré-exposição D15: S4= 0,14 ± 0,02; S5= 0,29 ± 0,04; S6= 0,59 ± 0,10; n=15; Incentivo ao aprendizado D15: S7= 0,87

$\pm 0,12$; S8: $1,39 \pm 0,17$; S9= $1,82 \pm 0,24$; n=15; Treinado D15: S10= $2,58 \pm 0,28$; S11= $2,46 \pm 0,29$; n=15) em relação ao seu controle (Pré-exposição D30: S4= $0,11 \pm 0,02$; S5= $0,29 \pm 0,05$; S6= $0,48 \pm 0,11$; n=15; Incentivo ao aprendizado D30: S7= $0,77 \pm 0,11$; S8: $1,12 \pm 0,15$; S9= $1,55 \pm 0,20$; n=15; Treinado D30: S10= $2,38 \pm 0,20$; S11= $2,52 \pm 0,16$; n=15)(Gráfico 5).

Gráfico 5 – Efeito do desmame precoce em sobre a busca por recompensa alimentar. Two-way ANOVA foi usada seguida pelo teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. Dados apresentados como média \pm SEM; D30, n = 15, D15, n = 15.



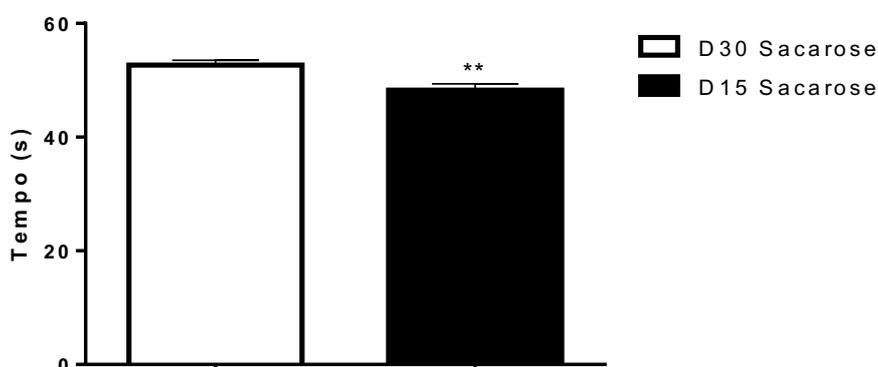
Fonte: a autora (2021).

6.5 TESTE DE REATIVIDADE AO PALADAR

Quanto ao efeito do desmame precoce na reatividade ao paladar, os animais desmamados precocemente (D15 Sacarose= $48,28 \pm 1,08$, n=9) apresentaram menor tempo de reação à sacarose quando comparados aos animais controle (D30-Sacarose= $52,68 \pm 0,87$, n=10; $p < 0,005$) (Gráfico 6). Do mesmo modo, o grupo

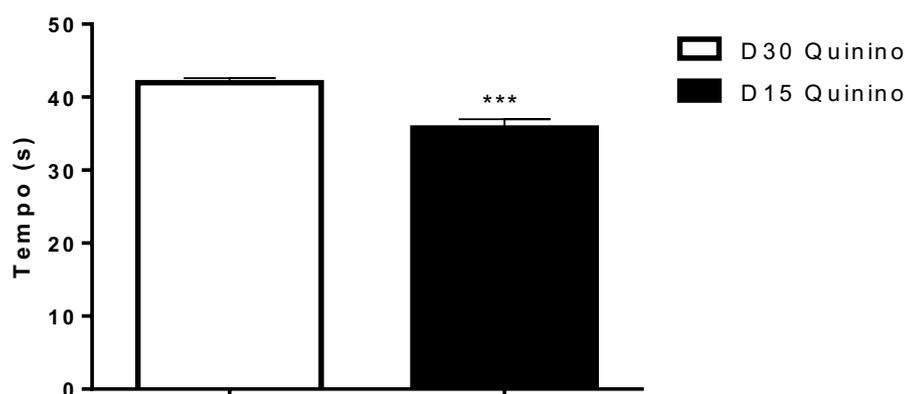
desmame (D15 Quinino= $35,76 \pm 1,22$, $n=10$) apresentou menor tempo de reatividade ao quinino, quando comparado ao grupo controle (D30-Quinino= $41,98 \pm 0,62$, $n=11$; $p<0,001$) (Gráfico 7).

Gráfico 6 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre a reatividade à sacarose. Foi utilizado o teste *t-Student*, $**p<0,005$. Os dados foram expressos em média e erro padrão. Grupos: D30, $n = 10$, D15, $n = 9$.



Fonte: a autora (2021).

Gráfico 7 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre a reatividade ao quinino. Foi utilizado o teste *t-Student*, $***p<0,001$. Os dados foram expressos em média e erro padrão. Grupos: D30, $n = 11$, D15, $n = 10$.



Fonte: a autora (2021).

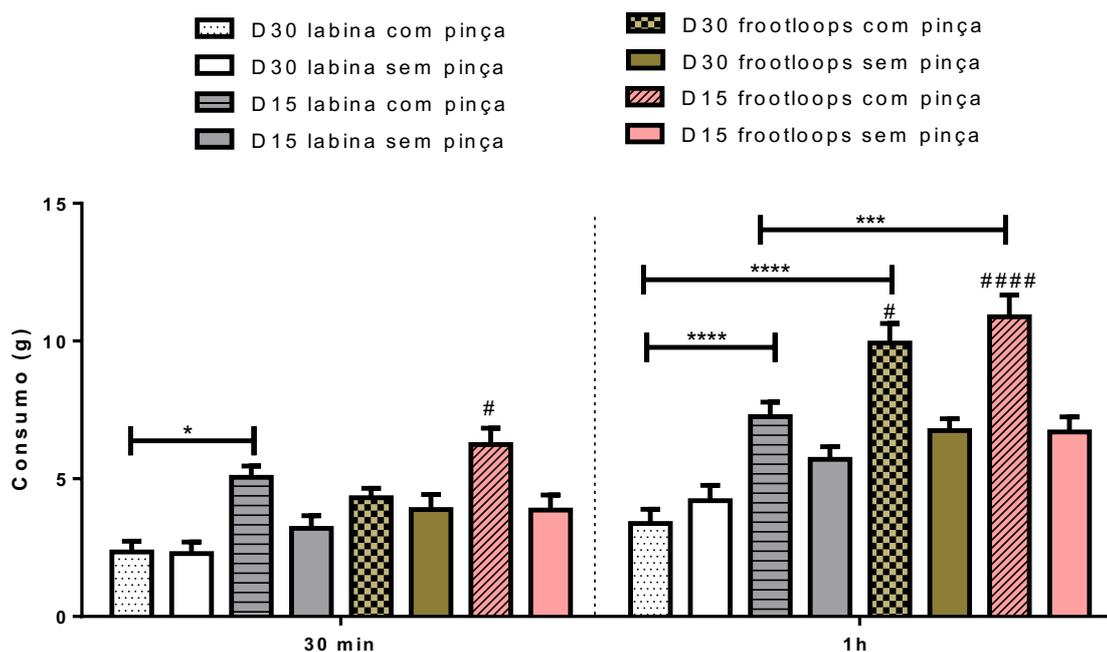
6.6 TAIL PINCH

Através do *Tail pinch* verificamos o efeito do desmame precoce no comportamento alimentar frente ao estresse leve ocasionado pelo pinçamento da cauda do animal. Com relação ao consumo de labina no tempo 30 minutos, foi observada diferença entre os grupos D30 com pinça ($2,74 \pm 0,19$, $n=15$; $p<0,05$) e D15 com pinça ($4,83 \pm 0,41$, $n=14$; $p<0,05$). Além disso, nesse tempo também foi observado maior consumo de alimento palatável (*Frootloops*®) no grupo D15 com pinça ($5,96 \pm 0,60$, $n=14$; $p<0,001$), quando comparado ao grupo D15 sem pinça ($4,19 \pm 0,55$, $n=14$; $p<0,001$). Não foram evidenciadas diferenças entre os demais grupos no tempo 30 minutos (D30 *frootloops* com pinça= $4,12 \pm 0,34$, $n=15$; D30 *frootloops* sem pinça= $3,88 \pm 0,55$, $n=13$; D30 labina sem pinça= $2,29 \pm 0,41$, $n=13$; D15 labina sem pinça= $3,34 \pm 0,45$, $n=14$).

Na avaliação do *Tail pinch* no tempo 1h, observamos que o estresse leve promoveu aumento do consumo de alimento palatável tanto no grupo controle (D30 *frootloops* com pinça= $9,53 \pm 0,71$, $n=15$; D30 *frootloops* sem pinça= $6,75 \pm 0,43$, $n=13$; $p<0,05$), quanto no grupo desmame (D15 *frootloops* com pinça= $10,41 \pm 0,79$, $n=14$; D15 *frootloops* sem pinça= $7,03 \pm 0,55$, $n=14$ $p<0,001$). Esse aumento também foi evidenciado na comparação dos consumos desses animais com seus respectivos grupos de dieta padrão ((D30 labina com pinça 1h= $4,34 \pm 0,51$, $n=15$); (D30 labina sem pinça 1h= $4,21 \pm 0,55$, $n=13$; $p<0,05$), (D15 labina com pinça 1h= $6,98 \pm 0,41$, $n=14$; D15 labina sem pinça 1h= $5,93 \pm 0,45$, $n=14$; $p<0,05$)).

A diferença entre os grupos D30 com pinça e D15 com pinça existente no tempo 30 min, foi acentuada no tempo 1 hora ($p<0,001$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre consumo alimentar de alimento palatável e dieta padrão 30 minutos e 1 hora após estresse leve causado pelo *Tail pinch*. One-way ANOVA, * $p<0.05$, *** $p<0.0001$. Dados apresentados como média \pm SEM; Grupos: D30 *frootloops* com pinça, $n=15$; D30 *frootloops* sem pinça, $n=13$; D30 labina sem pinça, $n=13$; D30 labina com pinça, $n=15$; D15 labina com pinça, $n=14$; D15 labina sem pinça, $n=14$; D15 *frootloops* com pinça, $n=14$; D15 *frootloops* sem pinça, $n=14$.



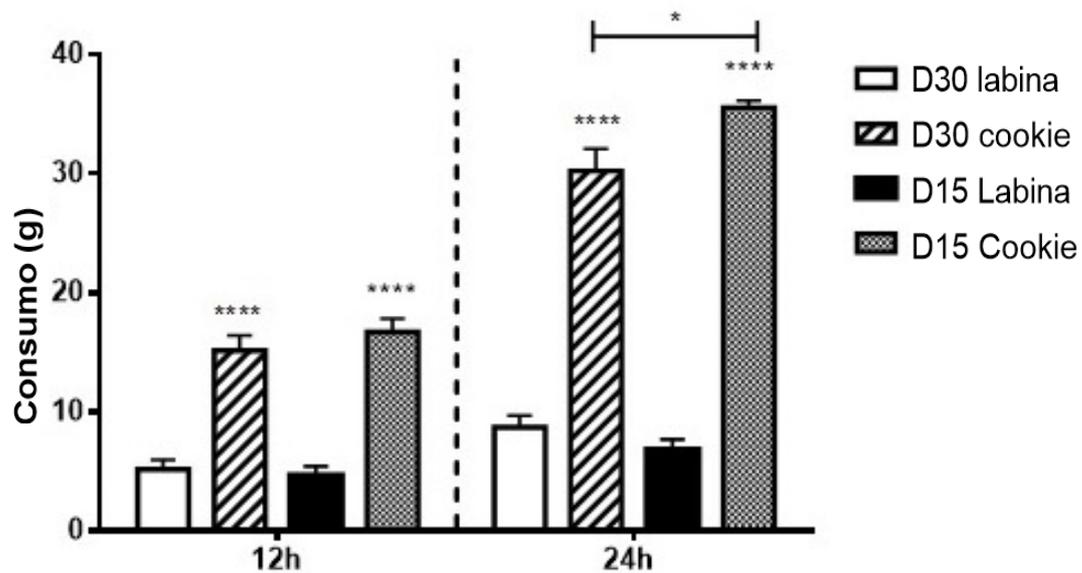
Fonte: a autora (2021).

6.7 TESTE DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR

O teste de preferência alimentar evidenciou maior consumo do alimento palatável em ambos os grupos tanto no tempo 12h ($F_{(3,60)} = 39.97, p < 0.0001$), apresentando os seguintes resultados: D30 labina 12h = $5,19 \pm 0,81$, n=16; D30 cookie 12h = $15,18 \pm 1,26$, n=16; D15 labina 12h = $4,67 \pm 0,89$, n=16; D15 cookie 12h = $16,71 \pm 1,12$, n=16.

A análise da preferência 24 horas ($F_{(3,60)} = 155.7$, $p < 0.0001$) revelou a análise de preferência de 24h revelou apresentar os seguintes resultados: D30 labina 24h = $8,71 \pm 1,01$, n=16; D30 cookie 24h = $30,24 \pm 1,85$, n=16; D15 labina 24h = $6,81 \pm 0,89$, n=16; D15 cookie 24h = $35,56 \pm 0,56$, n=16. No entanto, a diferença de consumo do alimento palatável entre o grupo D30 e D15 ($p < 0,05$) foi observada apenas no tempo 24h (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Efeito do desmame precoce em ratos sobre a preferência alimentar. *One-way ANOVA*, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$. Dados apresentados como média \pm SEM D30, $n = 16$, D15, $n = 16$.



Fonte: a autora (2021).

7 DISCUSSÃO

O bloqueio do sistema N/OFQ-receptor NOP foi utilizado com a finalidade de compreender os efeitos do desmame precoce nesse sistema e sua repercussão no controle do comportamento alimentar hedônico. Animais desmamados precocemente apresentaram maior consumo de alimento palatável quando desafiados em situação de estresse leve e breve, em comparação ao grupo controle. Esses animais também apresentaram preferência por doces e aumento do consumo de alimento palatável. Ao mesmo tempo, comportaram-se semelhantemente aos ratos controle no peso corporal, consumo e na resposta alimentar ao estresse diante da ração padrão. O bloqueio do sistema N/OFQ-receptor NOP foi capaz de normalizar o consumo de alimento palatável em animais desmamados precocemente e também diminuir esse consumo no grupo controle.

O desmame precoce é um modelo usado para imitar uma conduta social, na qual a amamentação é negligenciada e acaba influenciando parâmetros relacionados ao crescimento, fisiologia e comportamento (SILVA et al., 2020). Nesse sentido, a evolução do peso corporal é um dos primeiros aspectos a ser analisado. Na avaliação do peso corporal, não foram observadas diferenças entre os animais desmamados precocemente e os controles. Oliveira et al. (2011), demonstraram associação entre desmame precoce e o baixo peso logo após o desmame, seguido de recuperação de peso a partir do vigésimo dia de vida. Outros estudos, que utilizaram o mesmo protocolo de desmame, obtiveram achados semelhantes, sugerindo que esse efeito seja causado pela interrupção abrupta do aleitamento e sua concomitante substituição pelo consumo de alimento sólido, com composição nutricional distinta do leite materno (OLIVEIRA et al., 2011; LIMA, 2011; SILVA et al., 2020).

O leite materno sempre foi proposto como estimulante neuro-hormonal de fatores considerados críticos para o desenvolvimento hipotalâmico, em especial o núcleo arqueado (BOURET, DRAPER, SIMERLY, 2004). Outro componente essencial para o desenvolvimento endócrino e neuroquímico do indivíduo é a relação mãe-filhote. A ruptura desse vínculo é considerada um fator estressor intenso que induz a hiperatividade a longo prazo do HPA (LADD et al., 2000). Em nosso estudo, vimos que o estresse leve aumentou o consumo de alimento palatável em ambos os grupos. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, onde o evento estressor leve (*tail pinch*) aumentou a ingestão de leite condensado, sem alterar a ingestão da

dieta padrão (WALLACH et al., 1977; BERTIERE et al., 1984). Esses achados sustentam a hipótese de que o efeito do estresse no comportamento alimentar é dependente de sua intensidade e das características do alimento ofertado (TORRES, NOWSON, 2007). Exposição a vários estressores intensos, como restrição alimentar e *footshok*, reduzem o consumo alimentar de roedores, ao passo que estressores leves estimulam a ingestão de alimentos em ratos (SAMARGHANDIAN, 2003). Ademais, o estresse parece não ter efeito no consumo alimentar quando os alimentos disponíveis têm características hedônicas limitadas. Contudo, quando o alimento é densamente energético ou palatável, o estresse promove aumento no seu consumo (TORRES, NOWSON, 2007).

O comportamento alimentar representa uma resposta adaptativa, oriunda da necessidade do ambiente interno, sendo moldado por estímulos prescritos pelo ambiente externo (RAMOS, 2000). Esse comportamento é vulnerável a injúrias ocorridas nas fases iniciais da vida, resultando em repercursões na vida adulta (GLUCKMAN, HANSON, 2004). A literatura mostra que o cuidado materno recebido pelo recém-nascido tem efeitos críticos na resposta do sistema neuroendócrino ao estresse (CALDJI, DIORIO, MEANEY, 2000; KIKUSUI et al., 2006). A alimentação induzida pelo estresse ou 'alimentação de conforto' é um fenômeno caracterizado pelo aumento na ingestão alimentar quando confrontado com eventos emocionais ou fisicamente desafiadores (HU et al., 2016). O fator de liberação de corticotrofina (CRF), do inglês *Corticotropin releasing fator*, é um mediador de respostas ao estresse, e sua expressão no hipotálamo é acelerada sob estímulos estressantes (SAMARGHANDIAN, 2003). Conhecido por sua função na via ou eixo HPA, estimulando a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (pituitária), esse neuro-hormônio induz duplo efeito sobre a ingestão de alimentos, hiperfagia e anorexia, de maneira dependente do tipo de estresse e característica do alimento (HU et al., 2016). Estudos identificaram vários sítios no encéfalo de ratos que contêm altas densidades de neurônios CRFérgicos, incluindo núcleos amigdalóides, hipocampo, núcleo dorsal da rafe, *locus coeruleus* e córtex pré-frontal, estruturas protagonistas no controle do comportamento alimentar hedônico (PETT et al., 2000).

Em 2006, Kikusui e colaboradores observaram que camundongos desmamados precocemente apresentam aumento persistente do comportamento relacionado à ansiedade, bem como expressão alterada de RNA mensageiro (mRNA) de CRF no hipocampo. No presente estudo, observamos que em resposta ao estresse leve,

animais desmamados precocemente apresentaram maior consumo alimentar e que esse aumento foi intensificado diante do alimento palatável. Nossos achados refletem as alterações no comportamento alimentar promovidas pelos ajustes no metabolismo energético ocasionadas pelo estresse. Nesse sentido, sugere-se que os animais submetidos ao desmame precoce sejam mais susceptíveis aos efeitos do estresse sob o controle hedônico do comportamento alimentar.

Indivíduos expostos a injúrias alimentares e/ou privação do contato materno nas fases iniciais da vida apresentam maior tendência de consumo de alimentos palatáveis quando adultos (SILVA et al., 2014). A análise do consumo alimentar de dieta padrão demonstrou que, nas idades avaliadas, ambos os grupos possuem consumo semelhante. Entretanto, diante do alimento palatável, foi observado que os animais submetidos ao desmame precoce apresentaram maior consumo nas idades 60 e 90 dias de vida, quando comparados aos animais controles. Esses resultados estão em consonância com outros achados do nosso grupo de pesquisa que evidenciaram aumento da ingestão de alimentos palatáveis, além de retardo no ponto de saciedade na vida adulta de animais desmamados precocemente (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

Evidências indicam que os padrões dos ritmos alimentares podem ser modulados pelo comportamento materno (LEVIN, STERN, 1975). Animais desmamados precocemente possuem alterações dos períodos de alimentação durante as fases clara e escura (OLIVEIRA et al., 2011). Interessantemente, na avaliação do consumo de alimento palatável aos 90 dias, vimos que o consumo de *cookie* foi maior no grupo desmamado apenas no tempo 24h. Esse padrão comportamental também foi visto na avaliação da preferência alimentar, onde observamos que, embora ambos os grupos tenham preferido o alimento palatável, os animais desmamados precocemente consumiram mais *cookie* em comparação ao grupo controle no tempo 24h. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que os efeitos ocasionados pelo desmame precoce no controle hedônico do comportamento alimentar, poderiam talvez influenciar na ritmicidade alimentar frente a estímulo palatável.

Entre os principais fatores que influenciam as escolhas alimentares está a percepção dos alimentos e, mais particularmente, o gosto. A percepção gustativa é importante para garantir a aquisição de nutrientes e evitar a ingestão de substâncias tóxicas (CHANDRASHEKAR et al., 2006). Dentro do sistema sensorial, o paladar é o

único que tem associação inata com mecanismos de recompensa e aversão em resposta às qualidades das substâncias ingeridas (YAMAMOTO, 2006). A capacidade/intensidade com que cada indivíduo percebe os diferentes gostos chama-se sensibilidade gustativa, que varia entre indivíduos, e é um fator determinante nas escolhas alimentares e estado nutricional (TEPPER et al., 2014).

O gostar (*liking*), o querer (*wanting*) e o aprender (*learning*) são pilares sobre os quais repousa o comportamento alimentar hedônico. O *runway task incentive* é um teste experimental que avalia os componentes *wanting* e *learning* após privação alimentar (SILVEIRA et al., 2004). A análise desses componentes mostrou que o comportamento do grupo desmame é semelhante ao grupo controle. O gostar é a reação consciente relacionada a mecanismos cognitivos, cujo principal estímulo é o valor hedônico do paladar ou palatabilidade (YAMAMOTO, 2008). As informações sobre a palatabilidade são processadas em receptores distintos distribuídos nas papilas linguais. O sabor amargo é um gosto para o qual a reação é aversiva de forma inata, que aparece como defesa para evitar a ingestão de alimentos potencialmente tóxicos (CHANDRASHEKAR et al., 2006).

A percepção do amargo é mediada pelos receptores T2R acoplados às proteínas G nas membranas das células gustatórias. Entretanto, existem substâncias amargas permeáveis à membrana celular, e que não interagem com o receptor, ativando diretamente a proteína G. São exemplos o quinino e a cafeína (NAIM et al., 2002). No que concerne ao sabor doce, sabe-se que está associado ao prazer inato e à ingestão de alimentos ricos em hidratos de carbono e que, de modo geral, possuem elevado valor em termos energéticos. A percepção do gosto doce, diferentemente do sabor amargo, não se realiza pela entrada de moléculas doces no interior da célula, mas sim pela ligação das mesmas a receptores gustatórios, mais precisamente receptores acoplados às proteínas G (GPCR). O receptor envolvido na percepção do sabor doce é um heterodímero composto por duas subunidades proteicas, T1R2 (receptor tipo 1, membro 2) e T1R3 (receptor tipo 1, membro 3), codificados pelos genes *TAS1R2* e *TAS1R3*, localizados no cromossomo 1 humano (ZHAO et al., 2003; LIAO, SCHULTZ, 2003), apresentando a capacidade para detetar açúcares naturais, incluindo sacarose, glucose, frutose e maltose (ZHAO et al., 2003).

O córtex insular gustatório é capaz de responder a duas populações neuronais do paladar: uma população (Tipo 1), relacionada com a percepção sensorial dos sabores sem definição do valor de recompensa, e outra população neuronal que

mostra respostas excitatórias ao estímulo palatável (sacarose) e, inibitórias em resposta ao estímulo aversivo (quinino) (YAMAMOTO et al., 1989). A resposta hedônica dos sabores básicos está sujeita à “programação” fetal e perinatal (AYRES et al., 2012). Em nosso estudo, o teste de reatividade ao paladar revelou que os animais submetidos ao desmame precoce tem maior sensibilidade à substância aversiva e anedonia frente ao sabor doce. Esse mesmo padrão é encontrado em modelos experimentais de obesidade e sobrepeso cujas reações de prazer diminuídas são compensadas com o aumento do consumo alimentar energético, a fim de atingir padrões de recompensa alimentar (BELLISLE et al., 2012). Além disso, o desmame precoce seja por separação materna, ou por inibição da lactação através do tratamento materno com inibidor de prolactina, está associado a desnutrição neonatal (LIMA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), que também é apontada como preditora de prejuízos das informações sobre percepção de sabor e respostas hedônicas (SALAS et al., 2012). A associação desses achados sugere existência de um possível mecanismo de prejuízo do *liking* ocasionado pelas alterações decorrentes do desmame precoce.

O *liking* é resultado do impacto hedônico do alimento e seu estímulo é gerado especialmente pela via opiodérgica. Análises experimentais mostram que aplicações de antagonistas inespecíficos dos receptores opiodérgicos diminuem o consumo de alimento palatável, mesmo quando administrado em doses baixas, insuficientes para modificar a ingestão de dieta padrão (RUDSKI, BILLINGTON, LEVINE, 1994). Alternativamente, agonistas dos receptores opióides são particularmente eficazes no aumento da ingestão de dietas palatáveis (LEVINE, BILLINGTON, 1997). Além disso, os opióides também afetam a seleção de macronutrientes. Geralmente, ratos tratados com opiáceos tendem a preferir uma dieta rica em gorduras quando dietas com alto teor de carboidratos e gorduras são apresentadas simultaneamente (WELCH et al., 1994). No entanto, deve-se notar que a preferência inicial por determinado macronutriente dirige os efeitos dos opiáceos na seleção de macronutrientes. Em animais de laboratório, injeções de morfina elevam a ingestão de carboidratos em ratos que preferem carboidratos, enquanto aumentam a ingestão de dietas ricas em gordura, em animais que preferem gordura (GOSNELL, KRAHN, MAJCHRZAK, 1990). As particularidades da neurofisiologia opiodérgica no comportamento alimentar são ainda mais complexas quando tomamos em consideração seu mais jovem componente descrito: o sistema N/OFQ - receptor NOP.

Incluído no sistema opiodérgico e com mecanismos de atuação ainda pouco compreendidos, N/OFQ modula várias funções fisiológicas incluindo depressão, estresse, ansiedade, alimentação, atividade locomotora, temperatura corporal, substâncias abusos, memória e dor (WITKIN, 2014). Alguns estudos destacam o papel desse sistema no controle do comportamento alimentar, cuja atuação envolve neurotransmissores classicamente relacionados ao controle hedônico como a dopamina e a serotonina (OLSZEWSKI, 2002; OLSZEWSKI et al., 2010; LU, 2010). Estudos relacionados ao envolvimento da N/OFQ no comportamento alimentar, evidenciam que sua administração central induz hiperfagia e reduz a resposta aversiva aos alimentos (HARDAWAY et al., 2016; OLSZEWSKI et al., 2010). A avaliação do consumo de alimento palatável sob efeito da aplicação aguda de antagonista NOP evidenciou a reversão do fenótipo de ingestão alimentar palatável aumentada dos animais desmamados precocemente. Resultados semelhantes foram observados por Hardaway (2016), que reportou diminuição da ingestão de alimentos ricos em gordura após tratamento com antagonista do receptor NOP (SB 612111) em modelo animais de compulsão alimentar. Nossos achados relacionados ao consumo e preferência por alimentos palatáveis, somados às evidências reportadas pela literatura, sugerem que as alterações desencadeadas pelo desmame precoce no comportamento alimentar hedônico estejam associadas à disfunção do sistema N/OFQ-receptor NOP.

Caracterizado como injúria, o desmame precoce afeta mecanismos funcionais de controle do comportamento alimentar, resultando em alterações duradouras detectáveis no organismo adulto (PEIXOTO et al., 2019; PIETROBON et al., 2019). Esse foi o primeiro estudo que investigou o envolvimento da N/OFQ e seu receptor nas alterações do comportamento alimentar hedônico decorrentes do desmame precoce. Além disso, as análises realizadas trazem uma visão interessante sobre os mecanismos centrais que mitigam o controle hedônico do comportamento alimentar, destacando o antagonismo do NOP como alvo atraente para o tratamento de compulsão alimentar e obesidade. É importante ressaltar que mais estudos são necessários para entender totalmente o mecanismo de ação hipofágica dos antagonistas de NOP.

8 CONCLUSÃO

O bloqueio do receptor NOP diminui a ingestão alimentar palatável em animais controle, e normaliza o padrão de consumo de alimento palatável ocasionado pelo desmame precoce. Dessa forma, podemos sugerir que o desmame precoce causa disfunção do sistema N/OFQ-receptor NOP, resultando em alterações no consumo de alimentos palatáveis, resposta ao estresse agudo, na preferência alimentar e nos mecanismos de *liking* do comportamento alimentar hedônico.

Devido às diversas possibilidades observadas durante o trabalho propõe-se como perspectivas a análise da ativação neuronal, bem como a expressão gênica do NOP em áreas do sistema de recompensa alimentar. Além disso, se faz interessante avaliar diretamente o efeito do bloqueio do NOP nos mecanismos associados ao controle hedônico do comportamento alimentar (*liking, wanting, learning*) e a expressão gênica de dopamina e serotonina resultante do bloqueio do receptor NOP.

REFERÊNCIAS

AGUGGIA, J. P.; SUÁREZ, M. M.; RIVAROLA, M. A. Early maternal separation: Neurobehavioral consequences in mother rats. **Behavioural Brain Research**, v. 248, p. 25-31, july. 2013.

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**, v. 2012:657379, 2012.

BABICKY, A. et al. Onset and duration of the physiological weaning period for infant rats reared in nests of different sizes. **Physiologia Bohemoslouaca**, v. 22, p. 449-456, 1973.

BARKER, D.J. The fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, n. 6998, p. 171-174, july. 1995.

BAXTER, M. G.; MURRAY, E. A. The amygdala and reward. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 563-573, july. 2002.

BELLISLE, F. et al. Sweetness, Satiating, and Satiety. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 6, p. 1149-1154, june. 2012.

BERKSETH, K. E. et al. Hypothalamic gliosis associated with high-fat diet feeding is reversible in mice: A combined immunohistochemical and magnetic resonance imaging study. **Endocrinology**, v. 155, p. 2858–2867, 2014.

BERRIDGE, K. C. “Liking” and “wanting” food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. **Physiology & Behavior**, v. 97, n. 5, p. 537–550, 2009.

_____. ALDRIDGE, J. W. Special Review: Decision Utility, The Brain, and Pursuit of Hedonic Goals. **Social Cognition**, v. 26, n. 5, p. 621–646, 2008.

_____. KRINGELBACH, M. L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199, n. 3, p. 457-480, aug. 2008.

BERTHOUD, H. R.; MORRISON, C. The brain, appetite, and obesity. **Annual Review of Psychology**, v. 59, p. 55-92, 2008.

BERTIERE, M.C. et al. Stress and sucrose hyperphagia: role of endogenous opiates. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 20, p. 675-679, 1984.

BEWICK, G.A. et al. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and agouti-related protein (AgRP) neurons coexpress the NOP1 receptor and nociceptin alters CART and AgRP release. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3526–3534, aug. 2005.

BOURET, S.G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. **The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2797–2805, mar. 2004.

_____. SIMERLY, R. B. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. **Clinical Genetics**, v. 70, n. 4, p. 295-301, oct. 2006.

BRAKE, W. G. et al. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 1863-1874, 2004.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY, M.J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biological Psychiatry**, v.48, n. 12, p. 1164–1174, dec. 2000.

_____. et al. Maternal behavior regulates benzodiazepine/GABAA receptor subunit expression in brain regions associated with fear in BALB/c and C57BL/6 mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1344-1352, 2004.

CHANDRASHEKAR, J. et al. The receptors and cells for mammalian taste. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 288-294, 2006.

DARLAND, T.; HEINRICHER, M. M.; GRANDY, D. K. Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 5, p. 215–221, may. 1998.

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

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

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. **Journal of Visualized Experiments**. n. 65, july. 2012.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatric Research**, v. 56, n. 3, p. 311-317, july. 2004.

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.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Research**, v. 143, n. 2, p. 263-79, mar. 1978.

HAGHIGHI, A. et al. Opioid receptor mu 1 gene, fat intake and obesity in adolescence. **Molecular Psychiatry**, v. 19, p. 63–68, jan. 2013.

HARDAWAY, J. A. et al. Nociceptin receptor antagonist SB 612111 decreases high fat diet binge eating. **Behavioural Brain Research**, v. 307, p. 25–34, 2016.

HEINRICHER, M. M. Orphanin FQ/nociceptin: from neural circuitry to behavior. **Life Sciences**, v. 73, n. 6, p. 813–822, june. 2003.

HOLTZMAN, S.G. Suppression of appetitive behavior in the rat by naloxone: lack of effect of prior morphine dependence. **Life Sciences**, v. 24, n. 3, p. 219–226, jan. 1979.

HU, M. H. et al. Posterodorsal Medial Amygdala Mediates Tail-Pinch Induced Food Intake in Female Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 5, 2016.

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.

KALRA, S.P. et al. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 1, p. 68–100, feb. 1999.

KANARI, K. et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, p. 45–52, 2005.

KELLEY, A. E.; BERRIDGE, K. C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3306-3311, may. 2002.

KIKUSUI, T. et al. Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. **Behavioural Brain Research**, v.162, n. 2, p. 200-206, 2005.

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

KOOB, G. F. A Role for Brain Stress Systems in Addiction. **Neuron**, v. 59, n. 1, p. 11–34, july. 2008.

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

LALUMIERE, R. T. Optogenetic dissection of amygdala functioning. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 107, 2014.

LEVIN, R.; STERN, J. M. Maternal influences on ontogeny of suckling and feeding rhythms in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 89, n. 7, p. 711–721, 1975.

LEVINE, A. S.; BILLINGTON, C.J. Why do we eat? A neural systems approach. **Annual Review of Nutrition**, v.17, p. 597-619, 1997.

_____. GRACE, M.; BILLINGTON, C.J. Beta-funaltrexamine (beta-FNA) decreases deprivation and opioidinduced feeding. **Brain Reserch**, v. 562, n. 2, p. 281–284, oct. 1991.

LIAO, J.; SCHULTZ, P. G. Three sweet receptor genes are clustered in human chromosome 1. **Mammalian Genome**, v. 14, n. 5, p. 291-301, 2003.

LIMA, N.S. et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 1, p. 22-30, 2013.

_____. et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **The British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 9, p. 1405-1413, may. 2011.

LONEY, G. C. et al. Determinants of taste preference and acceptability: quality versus hedonics. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 29, p. 10086-10092, july. 2012.

LÜ, N. et al. Nociceptin/ Orphanin FQ in PAG modulates the release of amino acids, serotonin and norepinephrine in the rostral ventromedial medulla and spinal cord in rats. **Pain**, v. 148, p. 414–425, 2010.

MAGNI, P. et al. Feeding behavior in mammals including humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1163, p. 221-232, 2009.

MEUNIER, J. C. et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptorlike ORL1 receptor. **Nature**, v. 377, n. 6549, p. 532–535, oct. 1995.

MOGIL, J. S.; PASTERNAK, G. W. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 381–415, set. 2001.

MOLLEREAU, C.; MOULEDOUS, L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. **Peptides**, v. 21, n. 7, p. 907–917, july. 2000.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

NAIM, M. et al. Hypothesis of receptor-dependent and receptor-independent mechanisms for bitter and sweet taste transduction. **ACS Symposium Series**, v. 825, p. 2-17, 2002.

OLIVEIRA, L. S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 1, p. 119-124, jan. 2011.

_____. 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, jan. 2011.

OLSZEWSKI, P. Effect of nociceptin/orphanin FQ on food intake in rats that differ in diet preference. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 529–535, 2002.

_____. et al. Central nociceptin/orphanin FQ system elevates food consumption by both increasing energy intake and reducing aversive responsiveness. **American**

Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 299, n. 2, p. 655-663, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. World Health Organization. **Infant and young child feeding**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/en/>>. Acesso em: 20 de dez 2020.

ONG, T.P.; GUES, P.C. Nutritional Programming Effects on Development of Metabolic Disorders in Later Life. **Methods in Molecular Biology**, v. 1735, p. 3-17. 2018.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M.; AALINKEEL, R. Metabolic programming by nutrition during early development. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, n. 9, p. 849–855, 2000.

PECIÑA, S. et al. Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 28, p. 9395-9402, 2003.

PEIXOTO, T. C. et al. Early weaning alters the thermogenic capacity of brown adipose tissue in adult male and female rats. **European Journal of Nutrition**, aug. 2019.

PETT, K. V. et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 428, n. 2, p. 191 – 212, 2000.

PIETROBON, C. B. et al. Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in wistar rats of both sexes. **The Journal of Physiology**, 2019.

PISU, M.G. et al. Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 172–182, 2016.

POLIDORI, C.; DE CARO, G.; MASSI, M. The hyperphagic effect of nociceptin/orphanin FQ in rats. **Peptides**, v. 21, n. 7, p. 1051–1062, july. 2000.

RAMOS, L. M. S. M. Desenvolvimento do comportamento alimentar infantil. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 3, p. 8, 2000.

REDMAN, R. S.; SWENEY, L. R. Changes in diet patterns of feeding activity of developing rats. **Journal of Nutrition**, v. 106, p. 615-626, 1976.

REINSCHEID R. K. et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. **Science**, v. 270, n. 5237, p. 792-794, nov. 1995.

RUDSKI, J. M.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, A. S. Naloxone's effects on operant responding depend upon level of deprivation. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 2, p. 377-383, oct. 1994.

SALAS, M. et al. Effects of perinatal undernutrition on the development of neurons in the rat insular cortex. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 20-25, sept. 2012.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail-pinch-induced food intake of rats. **Neuroscience**, v. 116, n. 2, p. 519-524, 2003.

SCHLICKER, E.; MORARI, M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. **Peptides**, v. 21, n. 7, p. 1023–1029, july. 2000.

SHAW, W.N. et al. The effect of the opioid antagonist ly255582 on body weight of the obese Zucker rat. **International Journal of Obesity**, v. 15, p. 387–395, 1991.

SHIN, A. C. et al. Reversible suppression of food reward behavior by chronic mu-opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 170, n. 2, p. 580-588, oct. 2010.

SILVA, A. A. M. **Desnutrição perinatal e controle hedônico do comportamento alimentar**: papel do sistema serotoninérgico. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

SILVA, D. S. J. A. 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. 2, p. 9, 2013.

SILVA, M. T. et al. Immediate and Late Effects of Early Weaning on Rat Gastric Cell Differentiation. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, n. 1, p. 196, jan. 2020.

SILVA, N. P. 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**, v. 44, n. 4, p. 488-499, 2017.

SILVEIRA, P.P. et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 80, n. 5, p. 739–745, feb. 2004.

SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; BLOOM, S. R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 120-128, mar. 2009.

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. 352–363, mar. 2010.

SNYDER, S. H.; PASTERNAK, G. W. Historical review: Opioid receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 4, p. 198–205, apr. 2003.

STATNICK, M. A. et al. A Novel Nociceptin Receptor Antagonist LY2940094 Inhibits Excessive Feeding Behavior in Rodents: A Possible Mechanism for the Treatment of Binge Eating Disorder. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 2, p. 493–502, feb. 2016.

TEPPER, B. J. et al. Genetic sensitivity to the bitter taste of 6-n-propylthiouracil (PROP) and its association with physiological mechanisms controlling body mass index (BMI). **Nutrients**, v. 6, n. 9, p. 3363-3381, 2014.

TOLL, L. et al. Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 419–457, apr. 2016.

TORRES, S.J.; NOWSON, C.A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v. 23, n. 11-12, p. 887–894, nov-dec. 2007.

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. 288–298, 2012.

VICTORA, C.G. et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**, v. 387, p. 475-490, 2016.

WALLACH, M.B. et al. A new anorexigen assay: stress-induced hyperphagia in rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 6, p. 529-531, 1977.

WEISSMAN, ALICIA M. et al. Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 6, p. 1066-1078, 2004.

WELCH, C. C. et al. Preference and diet type affect macronutrient selection after morphine, NPY, norepinephrine, and deprivation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, p. 426–433, 1994.

WITKIN, J. M. et al. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 3, p. 283-299, mar. 2014.

WYNNE, K. et al. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 291-318, 2005.

YAMAMOTO, T. et al. Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 61, n. 6, p. 1244-1258, june. 1989.

_____. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. **Archives of Histology and Cytology**, v. 69, n. 4, p. 243–255, 2006.

_____. Central mechanisms of roles of taste in reward and eating. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 95, n. 2, p. 165-86, june. 2008.

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

ZHAO, G. Q. et al. The receptors for mammalian sweet and umami taste. **Cell**, v. 115, n. 3, p. 255-266, 2003.

APÊNDICE A - Produção científica com participação da aluna durante o doutorado.



Fator de impacto 2018: 2.792

Qualis Capes: B1

Undernutrition during pregnancy and lactation increases the number of fos-cells in the reward system in response to a 5-HT6 receptor agonist in male adolescent rats

Amanda Alves Marcelino da Silva, Mayara Matias Oliveira, Taisy Cinthia Ferro Cavalcante, Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida, Paula Luiza Menezes Cruz & Sandra Lopes de Souza

APÊNDICE B - Produção científica com participação da aluna durante o doutorado.

 <p>Leading the way in experimental and clinical research in hematology</p>	<p>Fator de impacto 2018: 16.601 Qualis Capes: A1</p>
<p style="text-align: center;">JANUARY 23, 2020</p> <p>Co-occurrence of <i>DNMT3A</i>, <i>NPM1</i>, <i>FLT3</i> mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis</p> <p>Tracking no: BLD-2019-003339R1</p> <p>Matheus Bezerra (Universidade Federal de Pernambuco, Brazil) Aleide Lima (Universidade Federal de Pernambuco, Brazil) Maria-Riera Piqué-Borràs (University Children's Hospital Beider Basel (UKBB) and Department of Biomedicine, University of Basel, Switzerland) Douglas Silveira (Hematology Department, AC Camargo Cancer Center, Brazil) Juan Coelho-Silva (Department of Internal Medicine, Medical School of Ribeirão Preto,, Brazil) Diego Pereira-Martins (Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Brazil) Isabel Weinhäuser (Medical School of Ribeirão Preto and Center for Cell-Based Therapy,) Pedro Franca Neto (Federal University of Pernambuco, Brazil) Lynn Quek (MRC Molecular Hematology Unit, University of Oxford, United Kingdom) Anna Corby (MRC Molecular Hematology Unit, University of Oxford, United Kingdom) Mayara Oliveira (Universidade Federal de Pernambuco, Brazil) Marinus Lima (Cancer Hospital of Pernambuco, Brazil) Reijane de Assis (Hematology and Transfusion Medicine Center, University of Campinas, Brazil) Paula De Melo Campos (University of Campinas/Hemocentro-Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue,) Bruno Duarte (Hematology and Transfusion Medicine Center, University of Campinas, Brazil) Israel Bendit (Faculdade de Medicina USP, Brazil) Vanderson Rocha (University of Oxford, United Kingdom) Eduardo Rego (Hematology and Transfusion Medicine Center, University of Campinas, Brazil) Fabiola Traina (University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School, Brazil) Sara Olala Saad (Hematology and Transfusion Medicine Center, University of Campinas, Brazil) Eduardo Beltrao (Federal University of Pernambuco, Brazil) Marcos Bezerra (Department of Hematology, Oxford University Hospitals NHS Foundation Trust, United Kingdom) Antonio Lucena-Araujo (Federal University of Pernambuco, Brazil)</p>	

APÊNDICE C - Produção científica com participação da aluna durante o doutorado.

 <p>IJDR <i>International Journal of Development Research</i></p>	<p>Fator de impacto 2019: 7.012 Qualis Capes: B1</p>
<p>EFEITO DA MANIPULAÇÃO DE INIBIDOR SELETIVO DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA SOBRE O CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA E ATIVAÇÃO NEURONAL NO HIPOTÁLAMO DE RATAS ADULTAS</p> <p>^{1,4}Amanda Alves Marcelino da Silva*, ²Mayara Matias Oliveira, ³Juliana Fonseca Nogueira Alves, ⁴Elton Gabriel Fernandes de Brito, ¹Taisy Cinthia Ferro Cavalcante and ^{2,5}Sandra Lopes de Souza</p>	

ANEXO 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, 12 de abril de 2018.

Ofício nº 15/18

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

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

Departamento de Anatomia

Centro de Biociências

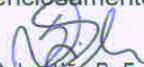
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0030/2017**

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeito do bloqueio do sistema nociceptina/orfanina-fq sobre o controle hedônico do comportamento alimentar de ratos submetidos ao desmame precoce”**. Registrada com o nº **0030/2017**, 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 04/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro 2018 – janeiro 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenio
Nº de animais	60
Peso/Idade	220g / 60 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691



**ANEXO B – ARTIGO: MATERNAL DEPRIVATION BY EARLY WEANING
CAUSES THE NOCICEPTIN TO ALTER THE PALATABILITY AND COOKIE
CONSUMPTION**

 <p><i>International Journal of Development Research</i></p>	<p>Fator de impacto 2019: 7.012 Qualis Capes: B1</p>
<p>MATERNAL DEPRIVATION BY EARLY WEANING CAUSES THE NOCICEPTIN TO ALTER THE PALATABILITY AND COOKIE CONSUMPTION</p> <p>Mayara Matias de Oliveira*¹, Paula Luiza Menezes Cruz², Elton Gabriel Fernandes de Brito³, Juliana Fonseca Nogueira Alves⁴, Keilla Maria Paz e Silva⁵, Flávia Regina Gonçalves de Araújo⁶, Taisy Cinthia Ferro Cavalcante⁷, Sandra Lopes de Souza^{1,7} and Amanda Alves Marcelino da Silva^{3,4}</p>	

ANEXO C – ARTIGO: THE FEED BEYOND NEED: MECHANISMS OF THE HEDONIC CONTROL OF EATING

<i>Artigo submetido</i> Indian Journal of Medical Research	Fator de impacto 2019: 1.503 Qualis Capes: B1
<p>Review</p> <p>The Feed Beyond Need: Mechanisms of the Hedonic Control of Eating</p> <p>Mayara Oliveira ¹, Keilla Silva ², Elton Brito ³, Flávia Araújo ², Taisy Cavalcante ^{4,5}, Amanda Silva ^{2,4,5,†} and Sandra Souza ^{1,6,†}</p>	