



UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

VÍCTOR ISAAC MELÉNDEZ DÍAZ

**Efeitos do Desmame Precoce Associado ao Estresse Alimentar Agudo e
Crônico Sobre os Comportamentos Emocional e Alimentar em Ratas *Wistar*
Fêmeas Adultas.**

Recife

2021

VÍCTOR ISAAC MELÉNDEZ DÍAZ

Efeitos do Desmame Precoce Associado ao Estresse Alimentar Agudo e Crônico Sobre os Comportamentos Emocional e Alimentar em Ratas *Wistar* Fêmeas Adultas.

Dissertação apresentada ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

Área de Concentração: Neurociências

Orientadora: Prof^a Dra. Sandra Lopes de Souza

Co-orientadora: Dra. Julliet Araújo de Souza

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Elaine Freitas, CRB4/1790

D542e

Díaz, Víctor Isaac Meléndez

Efeitos do Desmame Precoce Associado ao Estresse Alimentar Agudo e Crônico Sobre os Comportamentos Emocional e Alimentar em Ratas Wistar Fêmeas Adultas / Víctor Isaac Meléndez Díaz. – 2021.
87 f. : il.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices

1. Desmame. 2. Comportamento alimentar. 3. Fêmea. 4. Ratos wistar. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2022 - 016)

VÍCTOR ISAAC MELÉNDEZ DÍAZ

Efeitos do Desmame Precoce Associado ao Estresse Alimentar Agudo e Crônico Sobre os Comportamentos Emocional e Alimentar em Ratas *Wistar* Fêmeas Adultas.

Dissertação apresentada ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

Área de Concentração: Neurociências.

Aprovada em: 21/07/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Matilde Cesiana da Silva
Universidade Federal de Pernambuco - CAV

Prof^a Dra. Lisiane dos Santos Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco - CAV

Dra. Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Ageu Magalhães

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Sandra Lopes de Souza e a minha coorientadora, Julliet Araújo de Sousa, exemplos de mulheres excepcionais sem cuja guia eu não tivesse achado jeito algum nessa época difícil para todos nós. Agradeço meus colegas de turma e do laboratório pela sua ajuda e a sua acolhida que me fiz sentir no Brasil como se fosse meu próprio lar. Agradeço a minha amiga Maria Paz, que além de me oferecer sugestões valiosas trouxe um pouco do calor da minha terra para o Recife nesses anos. Agradeço ao meu companheiro de apartamento, João Barros Filho, pelo seu apoio constante. Finalmente agradeço a minha família por ter sido tanto uma inspiração como uma roca para mim mesmo eles estivessem longe.

RESUMO

O aleitamento materno é uma fonte de alimentação crucial à nutrição durante os estágios precoces da vida dos mamíferos, tendo influência sobre o desenvolvimento de diversas estruturas anatômicas e mecanismos fisiológicos até a vida adulta. A sua retirada precoce tem se associado a transtornos na alimentação e comportamentais, mas essas sequelas têm sido estudadas principalmente em machos, enquanto que nos humanos a prevalência deles é maior em mulheres. Em vista disso, no presente trabalho, objetivou-se submeter ratas Wistar fêmeas adultas, que tinham sido desmamadas precocemente (DP) mediante separação materna aos 15 dias de idade, a estresse alimentar agudo mediante exposição olfativa, sem consumo, à dieta palatável durante 22 dias. Nesse período, foi mensurada a ingestão de dieta padrão e água cada 24 horas e a ingestão de dieta palatável durante 1 hora a cada 7 dias, além de avaliar ansiedade usando o labirinto em cruz elevado e peso corporal em intervalos semelhantes. Nos resultados, foi demonstrado um menor consumo de dieta palatável por parte das ratas DP no dia 2 (Controle: $3,4 \pm 1,5$ vs DP: $1,8 \pm 1,3$, $p < 0,05$), um maior tempo de permanência na área central do labirinto das ratas DP na avaliação basal (Controle: $25,5 \pm 12,7$ vs DP: $47,9 \pm 22,4$, $p < 0,05$), e um maior tempo de permanência no braço aberto das ratas controle no dia 7 em comparação ao tempo basal (Basal: $36,5 \pm 15,5$ vs Dia 7: $79,2 \pm 38,0$, $p < 0,05$). Não foram evidenciadas diferenças significativas nos outros parâmetros. Portanto, pode-se concluir que o desmame precoce diminuiu a ingestão de alimento palatável após estresse agudo, sem efeito sobre outros parâmetros do comportamento alimentar. Com relação à ansiedade, o desmame precoce aumentou o tempo de permanência na plataforma central do labirinto em cruz elevado, sem efeitos sobre o tempo de permanência nos braços abertos e fechados.

Palavras-chave: desmame; comportamento alimentar; fêmea; ratos wistar.

ABSTRACT

Maternal lactation is a dietary source that proves crucial for mammals' nutrition during early stages of their development, influencing the development of diverse anatomical structures and physiological mechanisms well into adulthood. Its premature termination has been associated with alimentary and behavioral disorders, but these have been primarily documented in males, when they are most prevalent, in the case of humans, in women. In view of this we decided to submit adult female Wistar rats that had gone through early weaning (EW) through maternal separation at age 15 days to acute alimentary stress in the form of visual and olfactory exposition to a cafeteria diet sans consumption during for 22 days. During this period, we measured standard diet intake and water intake daily and cafeteria diet intake every 7 days. Additionally, we evaluated for anxiety using the elevated plus maze and measured body weight in similar intervals. Results showed less consumption of cafeteria diet among EW rats on day 2 (Control: $3,4 \pm 1,5$ vs EW: $1,8 \pm 1,3$, $p < 0,05$), more time spent in the maze's central area by the EW rats during the basal evaluation (Control: $25,5 \pm 12,7$ vs EW: $47,9 \pm 22,4$, $p < 0,05$), and more time spent in the maze's open arms by control group rats on day 7 when compared to the same group's basal time (Basal: $36,5 \pm 15,5$ vs Day 7: $79,2 \pm 38,0$, $p < 0,05$). No other significant differences were found. Therefore, it can be concluded that early weaning decreased palatable food intake after acute stress, with no effect on other parameters of eating behavior. Regarding anxiety, early weaning increased the length of stay on the central platform of the elevated plus-maze, with no effects on the length of stay in the open and closed arms.

Keywords: weaning; feeding behavior; female; rat, wistar.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	ALEITAMENTO E AMAMENTAÇÃO	11
2.2	DESMAME E DESMAME PRECOCE	11
2.3	COMPORTAMENTO ALIMENTAR	12
2.3.1	Hipotálamo	13
2.3.2	Rombencéfalo	15
2.3.3	Córtex cerebral	16
2.3.4	Via dopaminérgica mesolímbica	17
2.3.5	Hipocampo	22
2.3.6	Efeitos dos peptídeos segundo regiões	23
2.3.7	Comportamento alimentar e diferenças entre os sexos	24
2.4	ANSIEDADE	25
2.5	DESMAME PRECOCE E SEUS EFEITOS	27
2.5.1	Comportamento alimentar	27
2.5.2	Ansiedade e resposta neuroendócrina ao estresse	28
2.5.3	Desenvolvimento neural	30
2.5.4	Comportamento materno	30
2.5.5	Diferenças relacionadas ao sexo nos efeitos do DP	31
2.6	ESTRESSE	31
2.6.1	Estresse na vida precoce	32
2.6.2	Estresse na vida precoce e desordens comportamentais	33
3	HIPÓTESE	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVO GERAL	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	ANIMAIS	38

5.2	DESMAME PRECOCE E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	38
5.3	ESTRESSE ALIMENTAR E CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL ANTES E APÓS ESTRESSE.....	39
5.4	PESO CORPORAL	40
5.5	ANSIEDADE EXPERIMENTAL ANTES E APÓS ESTRESSE	40
5.6	CONSUMO DE DIETA PADRÃO APÓS ESTRESSE ALIMENTAR.....	41
5.7	CONSUMO DE ÁGUA APÓS ESTRESSE ALIMENTAR	41
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6	RESULTADOS	42
6.1	PESO CORPORAL	42
6.2	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	43
6.3	CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL	45
6.4	CONSUMO DE DIETA PADRÃO	46
6.5	CONSUMO DE ÁGUA.....	47
7	DISCUSSÃO	48
8	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE A- CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL	72
	APÊNDICE B- ARTIGO CIENTÍFICO PRODUTO DIRETO DA TESE SUBMETIDO A BEHAVIORAL SCIENCES	73

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o aleitamento materno exclusivo deve ser realizado durante os seis primeiros meses de vida, em humanos (OMS, 2017). Após esse período, a alimentação complementar é introduzida, paulatinamente, até que não haja mais a necessidade do aleitamento. Esse processo é denominado de desmame. Quando o desmame ocorre no momento certo é denominado de desmame natural. Por outro lado, quando ocorre antes do tempo previsto, é denominado de desmame precoce (OMS, 2017; LEVY et al., 2004).

O conhecimento sobre a importância do aleitamento materno evoluiu substancialmente nas últimas décadas. Inicialmente foi rejeitado como um mecanismo fisiológico que tinha sido tornado quase irrelevante pelo aumento do saneamento e da industrialização de alimentos em todo o mundo (1984). Essa atitude mudou à medida que os *insights* científicos revelaram o quão impactante o aleitamento materno pode ser na modulação de mecanismos em longo prazo, tanto fisiológicos (GIUGLIANI; HORTA; LORET DE MOLA; LISBOA; VICTORA, 2015) como outros (BOWATTE; THAM; ALLEN; TAN; LAU; DAI; LODGE, 2015). A amamentação, ou a falta dela, pode influenciar a fisiologia humana a tal ponto que as taxas de mortalidade infantil têm uma correlação direta com sua presença (SANKAR; SINHA; CHOWDHURY; BHANDARI; TANEJA; MARTINES; BAHL, 2015). O aleitamento confere proteção contra infecções importantes como serem a otite média e gastroenterite, além de prevenir a obesidade e resultar num engrossamento do córtex parietal (SHAMIR, 2016); também, previne o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 até num 38% (HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015). Esses resultados demonstram que o aleitamento tem um enorme efeito sobre o desenvolvimento do epigenoma, e que a sua duração tem um impacto sobre diversos mecanismos fisiológicos. A duração recomendada do aleitamento exclusivo em humanos é de 6 meses (KRAMER; KAKUMA, 2012), mas uma variedade de fatores de risco como retorno precoce ao emprego, tabaquismo e escolaridade baixa (LADOMENOU; KAFATOS; GALANAKIS, 2007; STUEBE; HORTON; CHETWYND; WATKINS; GREWEN; MELTZER-BRODY, 2014) podem resultar numa redução no tempo do aleitamento, o que se conhece como desmame precoce. No nordeste do Brasil, a prevalência do desmame precoce é de 11,9% (LOPES; LIMA; EVELIN;

LIMA; MOURA; MOURA; LIMA, 2017). Alguns dos mecanismos impactados pelo desmame precoce são aqueles que regulam a ingestão e a preferência alimentar, com esta relação tendo implicações importantes para a vida adulta (VENTURA, 2017; KANARI; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2005). Considerando que a regulação deste comportamento está associado aos estados emocionais, existe um grande interesse em analisar se a amamentação tem influência sobre outros comportamentos que afetam a busca de recompensa, como os estados de ansiedade (GROVER; GINSBURG; IALONGO, 2007).

A ansiedade é um dos transtornos mentais mais prevalentes durante a infância e pode ter um impacto significativo e prejudicial no desenvolvimento da criança (GROVER; GINSBURG; IALONGO, 2007). É uma disfunção na reatividade ao estresse de um organismo que é, em parte, mediada pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. O estresse é uma resposta fisiológica não específica a qualquer ameaça ou necessidade que o organismo pode enfrentar. (SELYE, 1976) Tanto o estresse no início da vida (ISHIKAWA; NISHIMURA; ISHIKAWA, 2015) quanto o desmame precoce (DP) (ITO; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2006), estão diretamente relacionados com o comportamento de ansiedade em ratos. Além disso, condições adversas no início da vida, em ratos, têm um efeito direto na preferência alimentar (MANIAM; MORRIS, 2010) e na ingestão de alimentos (HANCOCK; GRANT, 2009). Em contrapartida, o maior cuidado materno, caracterizado por aumento da sucção, reduz a ansiedade (WEBER; MANFREDO; RINAMAN, 2009). Isso levanta a questão de quanto desse efeito é devido ao desmame precoce ou ao aleitamento insuficiente. Portanto, no presente trabalho será investigado os efeitos do desmame precoce sobre o comportamento alimentar e emocional (comportamento semelhantes à ansiedade) em ratas Wistar adultas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ALEITAMENTO E AMAMENTAÇÃO

Em mamíferos, os cuidados parentais são essenciais para o desenvolvimento adequado do neonato (PLAUT; DAVIS, 1972). As mães, particularmente, têm um papel importante nesse período pois, além do contato físico, fornecem o alimento essencial para o adequado crescimento e desenvolvimento, o leite materno (PLAUT; DAVIS, 1972). Este é composto das quantidades ideais de água, proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, anticorpos e micro-organismos. O leite humano maduro contém 0,8-0,9% de proteínas, 6,9-7,2% de carboidratos, 3 a 5% de gordura, 0, 2% de minerais e um conteúdo energético de 60 a 75 Kcal/100ml de leite (PLAUT; DAVIS, 1979).

Em humanos, o aleitamento materno exclusivo é recomendado até os seis meses de vida pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017). Após esse período, é introduzida a alimentação complementar e o aleitamento exclusivo vai sendo, paulatinamente, substituído por outros tipos de alimento até que o indivíduo atinja o estado em que não é mais alimentado por qualquer tipo de aleitamento (OMS, 2017; LEVY et al., 2004). Esse processo é denominado de desmame.

2.2 DESMAME E DESMAME PRECOCE

O desmame é definido como a reorganização do desenvolvimento do comportamento de ingestão entre as formas de subsistência, desde subsistir exclusivamente do leite materno até a seleção e ingestão independente de alimentos sólidos (CRAMER; THIELS; ALBERTS, 1990). Mesmo influenciando fatores culturais, em humanos, essa transição à independência alimentar começa a se estabelecer quando o infante atinge 2,1 vezes o seu peso ao nascer. Isso acontece perto dos 3,5-4,5 meses nos meninos e 4-5 meses nas meninas. (HUMPHREY, 2010) Nessa idade é importante fornecer alimentos ricos em ferro e proteína devido a que os depósitos de ferro do nascimento começam a se acabar e o conteúdo de proteína do leite materno é insuficiente. Além disso, é necessário um estímulo neurológico oral para desenvolver a capacidade de consumir alimentação sólida do infante. O processo de desmame pode ser iniciado pelo infante (desmame natural) ou pela

mãe (desmame planejado). Os fatores culturais têm uma forte influência sobre o tempo de desmame planejado. Em culturas ocidentais, a tendência tem sido a um desmame cada vez mais precoce, enquanto que sociedades mais tradicionais desmamam seus infantes completamente até os 2-4 anos (2004).

Em ratos (*rattus norvegicus*), esse processo ocorre naturalmente durante o período de 20 a 35 dias após o nascimento, com um declínio constante no tempo em que os filhotes passam mamando a partir do dia 20. Na experimentação animal, esse desmame acontece aos 21 dias para aumentar a produtividade das fêmeas, já que elas apresentam estro no pós-parto (THIELS; ALBERTS, 1991). Além disso, o desmame é mediado pela disponibilidade de leite (THIELS; ALBERTS, 1985) e é acompanhado por uma variedade de mudanças fisiológicas.

O desmame é entendido como precoce quando ocorre de forma irregular, fora do seu tempo usual (THIELS; ALBERTS, 1991). Como citado anteriormente, em ratos, o desmame dura cerca de 35 após o nascimento. Nesse período, a partir do 14º dia de vida, o animal já é capaz de ingerir alimentos sólidos e, assim, a partir desta data alternam sua alimentação entre o leite e outros tipos de alimento até o desmame completo (LEVY et al., 2004). O DP, em ratos, carrega consigo várias alterações patológicas em fases posteriores da vida, variando de desnutrição (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011) a alterações na secreção de insulina pelo pâncreas (PIETROBON; MIRANDA; BERTASSO; MATHIAS; BONFLEUR; BALBO; REIS; LATORRACA; ARANTES; OLIVEIRA; LISBOA; MOURA, 2020) e diferenciação de células gástricas (GHIZONI; FIGUEIREDO; MOISAN; OGIAS; OSAKI; GAMA, 2014). Em capítulos posteriores, revisaremos algumas dessas mudanças no que se refere aos comportamentos que estamos interessados em estudar.

2.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Os mamíferos são organismos com grandes necessidades energéticas e, como tal, estão constantemente em busca de alimento. Para facilitar isso, a evolução traçou redes complexas e interligadas nos sistemas nervosos desses organismos que regulam os comportamentos envolvidos na busca e aquisição de alimentos (SAPER; CHOU; ELMQUIST, 2002). Entre esses, os dois principais sistemas são os que regulam a alimentação homeostática, que é impulsionada pela necessidade de obtenção de nutrientes e energia, e a alimentação hedônica, que

tem obtenção da sensação de prazer como seu principal alvo. Tradicionalmente, tem se descrito por separado as estruturas que compõem esses dois sistemas, mas agora sabe-se que estão intimamente interligados. Por isso, primeiramente, será feita uma descrição das principais áreas anatómicas e estruturas envolvidas e, logo após, será descrito o papel específico delas no comportamento alimentar.

2.3.1 Hipotálamo

O hipotálamo é uma estrutura crucial à regulação do comportamento alimentar. Ele é uma área pequena do diencefalo situada sob o tálamo, do qual é separado pelo sulco hipotalâmico, e nas paredes do III ventrículo. É composta, principalmente, de substância cinzenta agrupada em núcleos. É uma região importante para muitas funções do sistema nervoso, incluindo a regulação da homeostase e, portanto, tem uma variedade de estruturas importantes para a regulação de vários sistemas corporais, dentre eles o sistema que regula o comportamento. (MACHADO, 2010)

Sistemas de fibras, como o fórnix, dividem o hipotálamo em diversas áreas. Nesse caso, o fórnix divide o hipotálamo numa área medial e outra lateral. Além dessa, existe uma divisão do hipotálamo em três planos frontais: supra-óptico, tuberal e mamilar. A área medial contém os principais núcleos do hipotálamo, os quais se podem classificar de acordo com esses níveis frontais. Tem-se assim os núcleos supraquiasmático, supra-óptico e paraventricular no hipotálamo supra-óptico; núcleos ventromedial, dorsomedial e arqueado no tuberal; e, finalmente, mamilares e posterior no hipotálamo mamilar. (MACHADO, 2010)

Entre esses núcleos hipotalâmicos, o núcleo arqueado é o protagonista no comportamento alimentar. Apresenta dois grupamentos neuronais que produzem NPY e POMC que são essências para a promoção da fome e da saciedade, respectivamente. O grupamento Neuropeptido Y (NPY) co-expressa o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP) e o grupamento pró-ópiomelanocorina (POMC) co-expressa o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Esses neurônios apresentam receptores para sinais da periferia, como a ghrelina e a leptina. O comportamento alimentar homeostático é regulado, em grande parte, pela ação hormonal e, entre eles, a leptina é um dos hormônios mais importantes. Com um nome derivado da raiz grega *leptos* ou delgado, a leptina é secretada pelo tecido adiposo branco quando a plenitude tecidual é atingida (ZHANG; PROENCA;

MAFFEI; BARONE; LEOPOLD; FRIEDMAN, 1994) e, como tal, está presente em grandes quantidades em humanos obesos. Isso indica que esse hormônio não é, por si só, suficiente para induzir a saciedade, porém, a fome insaciável que surge quando seus receptores estão ausentes indica que ele é necessário para a saciedade (BARSH; SCHWARTZ, 2002). A expressão do receptor de leptina em ratos é mais alta no hipotálamo basal ventral e, mais especificamente, em seus núcleos Arqueado (ARC), Ventromedial, Dorsomedial e Pré-mamilar ventral (SCHWARTZ; SEELEY; CAMPFIELD; BURN; BASKIN, 1996). O hormônio atua a esse nível inibindo neurônios que contêm Neuropeptídeo Y (NPY) e Proteína Relacionada ao Agouti (AgRP) e ativando neurônios que sintetizam a Pró-opiomelanocortina (POMC) e o Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina (CART). Os dois primeiros antagonizam os receptores de melanocortina-4 e os três últimos são seus agonistas. O agonismo destes receptores é anorexigênico, enquanto que o agonismo dos receptores de NPY é orexigênico. Esses neurônios inervam o núcleo Paraventricular (PVN), o hipotálamo lateral e a medula espinhal (ELIAS; SAPER; MARATOS-FLIER; TRITOS; LEE; KELLY; TATRO; HOFFMAN; OLLMANN; BARSH; SAKURAI; YANAGISAWA; ELMQUIST, 1998). Adicionalmente o hipotálamo detecta mudanças nos níveis de ácidos graxos, o que tem um efeito sobre a gliconeogênese hepática.

Outro hormônio com importante ação no hipotálamo é a grelina. Foi descoberta pela primeira vez após a identificação de pequenos peptídeos conhecidos como secretagogos do hormônio do crescimento. Eventualmente, seu receptor e ligante endógeno foram identificados, sendo o ligante a grelina. Esta é secretada pelo estômago e seus níveis aumentam durante a privação alimentar (KOJIMA; HOSODA; DATE; NAKAZATO; MATSUO; KANGAWA, 1999). Ela inibe a sinalização vagal, enviando sinais de fome ao Sistema Nervoso Central (SNC). Seu papel no comportamento alimentar homeostático é mediado principalmente através do hipotálamo, alcançando-o através do Núcleo do Trato Solitário (NTS), ativando neurônios NPY / AGRP presentes no ARC (DATE; MURAKAMI; TOSHINAI; MATSUKURA; NIIJIMA; MATSUO; KANGAWA; NAKAZATO, 2002). Outro hormônio importante, que também atua no ARC é o Peptídeo YY. Este é um hormônio intestinal que diminui a ingestão de alimentos ao inibir os neurônios NPY / AgRP no ARC (JONES; NUNN; CHAMBERS; ØSTERGAARD; WULFF; LUCKMAN, 2019).

2.3.2 Rombencéfalo

O rombencéfalo é assim conhecido por se tratar da dilatação posterior do tubo neural no sentido céfalo-caudal. A partir dela se originam o tronco encefálico e o cerebelo. Por conta disso, o termo rombencéfalo é usado para descrever essas estruturas neuroanatômicas em conjunto. Além do seu envolvimento nos comportamentos alimentares o rombencéfalo tem um papel crucial na regulação sensorial, dos movimentos finos e das funções autonômicas (MACHADO, 2010).

O primeiro componente, em ordem ascendente, é o tronco encefálico. Ele se encontra entre a medula e o diencefalo, situando-se ventralmente ao cerebelo. Nele, fazem conexão 10 dos 12 pares de nervos cranianos. O tronco divide-se em bulbo, de ubiquação caudal, mesencéfalo, situado mais cranialmente e a ponte, situada entre ambos (MACHADO, 2010).

O bulbo raquidiano é uma estrutura com forma de cone, cuja extremidade caudal continua com a medula espinhal. Seu limite com a medula existe no plano horizontal do forame magno do osso occipital. Nele, achamos estruturas importantes como a pirâmide, que liga as áreas motoras do cérebro aos neurônios motores da medula mediante o trato piramidal, as origens dos nervos craneanos IX-XII e um canal que dá continuação direita ao canal central da medula percorrendo o bulbo e, eventualmente, formando o IV ventrículo. (MACHADO, 2010)

A ponte é a junção entre o bulbo e o mesencéfalo. Situa-se ventralmente ao cerebelo, repousando sobre a parte basilar do osso occipital e ao dorso da sela túrcica do esfenóide. Estruturas importantes da ponte incluem o pedúnculo cerebelar médio e as emergências dos pares cranianos V-VIII. (MACHADO, 2010)

O cerebelo é um órgão do sistema nervoso supra segmentar que se situa dorsalmente ao bulbo e à ponte. É separado do lobo occipital do cérebro pela tenda do cerebelo, feita de dura-máter. Liga-se à medula e ao bulbo pelo pedúnculo cerebelar inferior e à ponte e mesencéfalo pelos pedúnculos cerebelares médio e superior, respectivamente. Ele se subdivide em uma parte mediana, o vérmis, e em dois hemisférios laterais. É composto de um corpo de substância branca, o corpo medular, revestido de sustância cinzenta conhecida como o córtex cerebelar. Dentro do corpo medular existem quatro pares de núcleos de substância cinzenta: denteado, emboliforme, globoso e fastigial. (MACHADO, 2010)

A importância do rombencéfalo na regulação da alimentação está em sua capacidade de integrar os impulsos ascendentes vagais de saciedade e alterações na glicemia junto com sinais neurais descendentes do mesencéfalo e prosencéfalo. Ratos descerebrados mostram saciedade relativamente normal num teste de ingestão, mesmo sem processamento do prosencéfalo. Além disso, a injeção direita de análogos antimetabólicos da glicose no IV ventrículo resultou num aumento na ingestão. Adicionalmente, o núcleo médio do tracto solitário recebe, diretamente, informação do nervo vago sobre as propriedades nutricionais e físicas do alimento. A importância desse núcleo à alimentação fica ainda mais evidente conhecendo suas eferências ao núcleo motor dorsal do vago, envolvido em movimentos do consumo e ingestão, como movimentos da língua e do queixo. Além disso, envia eferências ao prosencéfalo tendo, assim, um efeito sobre a recompensa alimentar, demonstrando, portanto, a integração fundamental dos dois sistemas de regulação alimentar nesse nível. (LIU; KANOSKI, 2018)

A área postrema é uma área logo acima do NTS, que está fora da barreira hematoencefálica e que é o local no qual atuam vários hormônios e aferências importantes (BROADWELL; BRIGHTMAN, 1976). O Peptídeo semelhante ao glucagon 1 é um hormônio circulante que ativa a área postrema induzindo uma sensação de saciedade. Além disso, sua ativação faz com que ratos desenvolvam aversão a novos sabores o que indica que ele produz a sensação desagradável que acompanha a superalimentação (SEELEY; BLAKE; RUSHING; BENOIT; ENG; WOODS; D'ALESSIO, 2000). Outro hormônio importante é a Colecistoquinina. Esta reduz a ingestão de alimentos em ratos e atua na área pós-estrema (VAN DER KOOY, 1984).

Além disso, o SNC recebe aferentes do trato gastrointestinal transportados pelo nervo vago através do núcleo do trato solitário e área postrema que ajudam na regulação da fome, transportando informações sensoriais sobre distensão gástrica e informações sobre os níveis de glicose e lipídios no fígado (SAPER, 2002).

2.3.3 Córtex cerebral

O córtex cerebral é a camada de substância cinzenta que reveste o centro branco do cérebro. Nele, chegam impulsos provenientes de todas as vias de sensibilidade; é aqui que se tornam conscientes e são interpretados. É uma das partes mais importantes do sistema nervoso e poderia se dizer que é a parte que

nos faz humanos, já que o desenvolvimento evolutivo do comportamento e a capacidade intelectual do humano se acompanhou do crescimento progressivo do córtex. O córtex é dividido de acordo com uma variedade de critérios, como estruturais e funcionais, mas a divisão mais empregada na prática médica é a anatômica e será essa a utilizada nesta revisão. (MACHADO, 2010)

O córtex prefrontal está envolvido na regulação da alimentação, exercendo uma função inibitória. Ele apresenta uma maior ativação após administração de leptina em pessoas com um déficit congênito de leptina, além de que, em roedores, diminui a ingestão impulsiva de alimento palatável.(LIU; KANOSKI, 2018)

O córtex insular modula o valor assignado à comida manipulando a expectativa ao codificar a percepção de prazer do gostos. Além disso, emite projeções ao córtex orbitofrontal que integra estímulos auditivos, olfativos, visuais e cognitivos. Essa via é responsável por assignar um valor de recompensa aos estímulos do alimento palatável. O córtex orbitofrontal, por sua vez, regula a Satedade Sensório-Específica, fenômeno durante o qual um animal tem menor irrigação no córtex orbitofrontal após comer, e está envolvido no valor de recompensa e no prazer de estímulos de gosto em humanos.(LIU; KANOSKI, 2018)

2.3.4 Via dopaminérgica mesolímbica

O comportamento alimentar hedônico é definido como o consumo motivado pelo prazer e recompensa (SAPER; CHOU; ELMQUIST, 2002). É regulado pela interação complexa entre hormônios e neurotransmissores, como leptina, grelina, insulina, dopamina e endocanabinóides em regiões neuroanatômicas identificadas como centros de recompensa. Muitos desses centros de recompensa fazem parte da via dopaminérgica mesolímbica. Ela se origina na Área Tegmentar Ventral (VTA), projetando-se para o corpo estriado ventral, o sistema límbico e, eventualmente, atingindo o córtex pré-frontal. Essa via é importante na regulação do comportamento emocional e na patogênese da esquizofrenia, além disso, tem um papel importante na fisiopatologia das adicções e, como será apresentado, na regulação do tipo de comportamento alimentar chamado de hedônico. (MACHADO, 2010)

Uma das estruturas envolvidas é o núcleo accumbens (NAc). É um dos núcleos da base, os quais são massas de substância cinzenta no interior de cada

hemisfério cerebral. Situa-se entre o putâmen e a cabeça do núcleo caudado e é também conhecido como estriado ventral. (MACHADO, 2010) Seu envolvimento na regulação da alimentação fica evidente quando se percebe que o consumo alimentar aumenta a dopamina extracelular nele (BASSAREO; DI CHIARA, 1997). No entanto, a depleção dopaminérgica no NAc, apenas, não é suficiente para afetar a quantidade de alimento ingerido. Em vez disso, parece afetar os aspectos motores da alimentação, como a mobilidade e a duração da alimentação (BALDO; SADEGHIAN; BASSO; KELLEY, 2002).

A desregulação da dopamina no NAc é um achado repetido em estudos que descrevem mudanças anatomicamente específicas causadas pelo abuso de substâncias [DI CHIARA; IMPERATO, 1986]. Mudanças semelhantes foram descritas em estudos realizados com o uso de alimentos palatáveis (AVENA; LONG; HOEBEL, 2005), o que levanta a questão se as substâncias que causam vício e os alimentos palatáveis produzem essas mudanças por meio de mecanismos compartilhados.

Há uma variedade de mecanismos que regulam as funções alimentares do NAc. Um desses mecanismos, que tem sido descrito recentemente, é a estimulação das células GABAérgicas no NAc pela zona incerta, uma zona subtalâmica conhecida por receber informações relativas à distensão gástrica. Esta via GABAérgica aumenta a função gástrica e a ingestão de alimentos por meio de sua ação sobre o NAc (WANG; ZHANG; LENG; LUAN; GUO; SUN; GAO; LIU; QIN; XU, 2020).

Além disso, os sistemas glutamatérgico e endocanabinóide estão envolvidos neste nível. Um estudo realizado com camundongos mutantes Glu-CB1R-KO descobriu que a falta de atividade do CB1R tem um efeito excitatório sobre os neurônios glutamatérgicos na camada pré-límbica do córtex pré-frontal medial, o qual, por sua vez, leva a um aumento do tônus glutamatérgico no NAc, com um aumento concomitante na resiliência a comportamentos alimentares compulsivos (DOMINGO-RODRIGUEZ; RUIZ DE AZUA; DOMINGUEZ; SENABRE; SERRA; KUMMER; NAVANDAR; BADDENHAUSEN; HOFMANN; ANDERO; GERBER; NAVARRETE; DIERSSEN; LUTZ; MARTÍN-GARCÍA; MALDONADO, 2020).

O receptor 2 da neuromedina U (NMUR2), um receptor neuropeptídeo do SNC envolvido na regulação do comportamento alimentar, também está presente no NAc de ratos, onde sua densidade se correlaciona positivamente com a compulsão

alimentar de misturas de alimentos gordurosos na concentração de 20% e 40%, estando, esta última, na mesma faixa de concentração de alimentos comumente consumidos em excesso por humanos (SMITH; KASPER; ANASTASIO; HOMMEL, 2019).

A expressão do receptor do Fator de Liberação de Corticotropina (CRF) aumentou na camada mais externa e no núcleo do NAc em ratos submetidos a estresse crônico. Além disso, este mesmo estudo mostrou que os receptores dopaminérgicos D2 aumentaram no núcleo do NAc de grupos com estresse crônico e diminuíram na camada mais externa do NAc de grupo não estressado com consumo excessivo de gordura. A expressão do receptor opioide Mu aumentou no núcleo do NAc de grupos com estresse crônico, mas diminuiu na camada mais externa (WEI; QUAN; ZHAO; YU; XIE; ZENG; MA; WANG; TANG; WU; ZHU, 2019).

Os *insights* sobre a função que o hipotálamo lateral (LH) desempenha na estimulação do NAc incluem o aumento da expressão de c-Fos e Orexin-A após estimulação elétrica do LH e um aumento no consumo de alimento palatável comparável à microinjeção de Orexina-A (LIU; GAO; ZHANG; JIN; SUN; LUAN; XU; GUO, 2020). A leptina, por sua vez, reduz a ativação no Caudado-NAc de humanos, demonstrando, assim, que a leptina diminui a resposta de recompensa alimentar (FAROOQI; BULLMORE; KEOGH; GILLARD; O'RAHILLY; FLETCHER, 2007).

A amígdala é outra estrutura importante da via mesolímbica, outro dos núcleos da base. Ela tem forma esférica e 2 cm de diâmetro, situando-se no polo temporal do hemisfério cerebral em relação com a cauda do núcleo caudado. É um importante centro regulador do comportamento sexual e agressividade. (MACHADO, 2010) A amígdala tem a capacidade de anular a saciedade por meio do efeito que as pistas aprendidas têm sobre sua área basolateral (BLA) (PETROVICH; GALLAGHER, 2003). Embora, tradicionalmente, tenha sido postulado que ela age principalmente para evitar estímulos aversivos (PETROVICH; GALLAGHER, 2003), também foi mostrado que um alto valor de incentivo pode alterar os mecanismos normais de retroalimentação (ARANA; PARKINSON; HINTON; HOLLAND; OWEN; ROBERTS, 2003). Por exemplo, um estudo optogenético, conduzido para analisar se a estimulação da BLA tem um efeito sobre o condicionamento apetitivo, descobriu que ela reforça os sinais de recompensa, embora não tenha um efeito primário de recompensa por si só (SERVONNET; HERNANDEZ; EL HAGE; ROMPRÉ; SAMAHA, 2020). Portanto, pode-se conceituar um possível papel da amígdala no

comportamento alimentar hedônico. Um estudo de ressonância magnética funcional realizado em participantes humanos encontrou uma associação entre pequenas alterações de volume na amígdala basolateral e sintomas de dependência alimentar em indivíduos em jejum expostos a imagens contrastantes de alimentos com alto teor calórico *versus* alimentos com baixa caloria (PURSEY; CONTRERAS-RODRIGUEZ; COLLINS; STANWELL; BURROWS, 2019). Além disso, os estados emocionais têm um impacto na reação do cérebro aos estímulos alimentares visuais, uma relação mediada pela amígdala esquerda, que mostra uma diferença maior entre os estímulos alimentar e do objeto após o *priming* neutro do que após o *priming* negativo (GARCÍA-GARCÍA; KUBE; MORYS; SCHRIMPF; KANAAN; GAEBLER; VILLRINGER; DAGHER; HORSTMANN; NEUMANN, 2020).

A existência dessa função pode ser esclarecida por meio de estudos realizados em populações neurais muito específicas. Por exemplo, um estudo feito em neurônios CeA^{Htr2a} na Amígdala central (CeA) descobriu que, quando estimulado, este subgrupo específico de células neuronais pode resultar em alimentação adicional quando as necessidades homeostáticas foram atendidas, e quando removido cirurgicamente, sua ausência resulta em alimentação menor, mesmo quando a motivação para a alimentação é alta (DOUGLASS; KUCUKDERELI; PONSERRE; MARKOVIC; GRÜNDEMANN; STROBEL; ALCALA MORALES; CONZELMANN; LÜTHI; KLEIN, 2017). Além disso, as projeções insulares para a CeA reduziram a alimentação e aumentaram a latência para a alimentação quando estimuladas exclusivamente por optogenética (ZHANG-MOLINA; SCHMIT; CAI, 2020).

O estriado é um núcleo subcortical essencial para iniciar o consumo alimentar (SMALL; ZATORRE; DAGHER; EVANS; JONES-GOTMAN, 2001). Ele é composto de três núcleos menores: núcleo caudado, putâmen e globo pálido. As conexões do estriado com o sistema límbico se situam no pálido. O comportamento alimentar é fortemente mediado por projeções de dopamina neste núcleo; por exemplo, o consumo recomeça assim que a dopamina é restaurada ao estriado dorsal de camundongos cuja dopamina havia sido depletada anteriormente (ROBINSON; RAINWATER; HNASKO; PALMITER, 2007). Ele mostra menos atividade neural quando atinge a saciedade, o que aponta para uma possível desregulação nesse núcleo quando a alimentação hedônica é iniciada. Isso é corroborado pelo fato de que indivíduos com menor densidade do receptor estriatal D2 e sinalização

dopaminérgica estriatal atenuada comem em excesso e têm maior propensão para a obesidade (BALDO; SADEGHIAN; BASSO; KELLEY, 2002).

Um componente essencial do sistema de recompensa límbico, a VTA, faz parte da formação reticular, situando-se na parte ventral do tegmento do mesencéfalo e medialmente à substância negra. Ela é rica em neurônios de dopamina (MACHADO, 2010) e, como tal, é um importante alvo de pesquisa sobre o comportamento alimentar hedônico. Por exemplo, sabor doce e alto teor de glicose, juntos, têm um impacto maior na resposta dependente do nível de oxigênio no sangue (do inglês, BOLD), no VTA, do que qualquer um desses parâmetros isoladamente (VAN OPSTAL; VAN DEN BERG-HUYSMANS; HOEKSMAS; BLONK; PIJL; ROMBOUTS; VAN DER GROND, 2019). A administração prévia de glicose intraperitoneal diminuiu significativamente o efeito orexigênico da grelina sobre o efeito da ingestão de alimentos em camundongos, o que reforça ainda mais a sensibilidade do VTA aos parâmetros metabólicos (LOCKIE; STARK; SPANSWICK; ANDREWS, 2019). Além disso, uma correlação positiva entre o Índice de Massa Corporal, a conectividade da substância branca das regiões VTA-NAc e o desejo por açúcar foi observada na tractografia probabilística em seres humanos (FRANCKE; TIEDEMANN; MENZ; BECK; BÜCHEL; BRASSEN, 2019). Pesquisas sobre as ações dos ácidos graxos nessa área descobriram que a injeção intra-VTA de ácido oleico reduziu significativamente a ingestão de alimentos, suprimiu a recompensa alimentar e inibiu a atividade da dopamina (HRYHORCZUK; SHENG; DÉCARIE-SPAIN; GIGUÈRE; DUCROT; TRUDEAU; ROUTH; ALQUIER; FULTON, 2018). A optogenética mostrou que o disparo de explosão fásica de neurônios dopaminérgicos nessa região acontece com recompensas inesperadas e imprevisíveis e que têm um efeito de reforço particularmente forte (GUTIERREZ; LOBO; ZHANG; LECEA, 2011). Além disso, o sistema serotoninérgico está envolvido nessa resposta por meio das ações do receptor 5HT_{2C}. Agonistas seletivos como a Lorcaserina reduzem a ingestão de alimentos aumentando a atividade GABAérgica na VTA (VALENCIA-TORRES; OLARTE-SÁNCHEZ; LYONS; GEORGESCU; GREENWALD-YARNELL; MYERS; BRADSHAW; HEISLER, 2017). O envolvimento GABAérgico vem de aferências do Hipotálamo lateral e atua ao nível do *Locus Coeruleus* para induzir a alimentação independentemente da saciedade (MARINO; MCDEVITT; GANTZ; SHEN; PIGNATELLI; XIN; WISE; BONCI, 2020).

A expressão do receptor 1 do fator de liberação de corticotropina (CRF) diminuiu na VTA de ratos submetidos ao estresse crônico (WEI; QUAN; ZHAO; YU; XIE; ZENG; MA; WANG; TANG; WU; ZHU, 2019). Normalmente, quando o CRF atua sobre a VTA, a motivação alimentar diminui (WANAT; BONCI; PHILLIPS, 2013), mas quando a cocaína é administrada anteriormente, essa supressão do comportamento de busca por alimento está ausente, o que pode indicar uma alteração específica da droga na sinalização motivacional do CRF na VTA (OLIVA; DONATE; LEFNER; WANAT, 2019).

O LH também é uma fonte importante de aferências regulatórias para a VTA, muitas das quais são agrupadas de acordo com o neurotransmissor. Entre eles, há os neurônios orexina (LH_{HCRT}), que regulam o comportamento motivado para recompensas salientes ao potencializar a liberação de dopamina no NAc. Os neurônios do hormônio concentrador de melanina, por sua vez, aumentam o consumo de alimentos de uma maneira dependente de energia. Os neurônios que expressam leptina suprimem a alimentação e aumentam a expressão da tirosina hidroxilase. Os neurônios que sintetizam neurotensina suprimem a ingestão de alimentos, possivelmente, devido à hiperativação comportamental secundária à liberação de dopamina no NAc, um efeito semelhante ao dos neurônios de transcrição regulada por cocaína e anfetamina (CART). Os neurônios do glutamato passam pela habênula lateral antes de atingir a VTA e inibir o comportamento de ingestão, enquanto as projeções GABAérgicas do LH inibem as células VTA GABAérgicas, desinibindo a liberação de dopamina no NAc e promovendo o consumo de alimentos (GODFREY; BORGLAND, 2019).

Um subconjunto de neurônios dopaminérgicos na VTA que expressam receptores de leptina, se projetam para o NAc, mas os níveis de leptina no mesencéfalo são muito baixos e parecem ter pouco ou nenhum efeito na sinalização da leptina dentro da VTA (PALMITER, 2007).

2.3.5 Hipocampo

O hipocampo é uma elevação curva e muito pronunciada que se dispõe acima do giro para-hipocampal. É composto por um tipo de córtex antigo conhecido como arquicórtex e é outro componente importante do sistema límbico. O consumo hedônico é definido como o consumo motivado pelo prazer e recompensa (SAPER; CHOU; ELMQUIST, 2002). Ele é um centro de regulação da ingestão alimentar onde

se integram informações sensoriais e interoceptivas com memórias de experiências anteriores. O poder dessas últimas para modificar a saciedade é tal que a presença de distrações durante a ingestão ou de lesões hipocampais podem ter um impacto substancial sobre as quantidades de comida ingerida após uma refeição. O hipocampo também modula o condicionamento entre estímulos alimentares externos e interoceptivos, além de mediar o efeito das “ambiguidades previsíveis”, situações onde um estímulo tem desfechos variáveis dependendo do contexto.

A sub-região ventral do hipocampo está envolvida na regulação desses processos através da geração de sinais endócrinos. É um sítio-alvo da grelina por conta da sua expressão de receptores de grelina GHSR1A, o que não acontece no hipocampo dorsal. Essa atividade age sobre neurônios produtores de orexina na área lateral hipotalâmica. Adicionalmente, existe sinalização do prosencéfalo mediante projeções ao septo lateral e ao córtex pré-frontal medial. (LIU; KANOSKI, 2018)

Mesmo que se faça a distinção entre alimentação hedônica e alimentação homeostática por razões práticas, aos níveis anatômico e neurobiológico essa distinção perde importância. Estruturas tradicionalmente associadas com a alimentação homeostática como o nervo vago influem na função e neurogênese hipocampal, uma estrutura fortemente vinculada à alimentação hedônica. O mesmo acontece com o ARC e a atividade dos seus neurônios AgRP e POMC, tendo a novidade do alimento consumido e a presença de estímulos alimentares condicionados um efeito sobre a ativação dos neurônios AgRP desse nível. (LIU; KANOSKI, 2018) É assim que achados recentes têm fornecido um entendimento mais integral do comportamento alimentar.

2.3.6 Efeitos dos peptídeos segundo regiões

Os peptídeos reguladores do comportamento alimentar mais importantes agem principalmente sobre cinco regiões cerebrais específicas: o hipocampo, a amígdala, a ínsula e os córtex orbito frontal e cingulado anterior. No hipocampo, a grelina tem um efeito ativador, enquanto a insulina tem um efeito inibitório, exceto quando tem exposição a imagens de comida com alto teor calórico. Na amígdala, existe ativação por parte da grelina, da colecistoquinina, e do GLP-1 em sujeitos obesos. Por enquanto, o Peptídeo YY e a insulina inibem a amígdala. A ínsula é ativada pela colecistoquinina, pela leptina nas suas regiões média e posterior e

geralmente é ativada pela grelina, exceto no período pós-prandial. O PYY, GLP-1 e insulina a inibem. O córtex orbito frontal é ativado pela grelina e pelo PYY na sua região caudolateral. É inibido pelo GLP-1, pela leptina e pela insulina. Finalmente, o córtex cingulado anterior é ativado pelo PYY e inibido pela leptina e insulina (ZANCHI; DEPOORTER; EGLOFF; HALLER; MÄHLMANN; LANG; DREWE; BEGLINGER; SCHMIDT; BORGWARDT, 2017).

2.3.7 Comportamento alimentar e diferenças entre os sexos

Existe consenso sobre os efeitos dimórficos entre machos e fêmeas dos hormônios esteroides gonadais sobre a diferenciação do Sistema Nervoso Central. O hipotálamo tem uma série de dimorfismos documentados, o que atinge especial importância quando se considera que é um dos centros principais da regulação do comportamento alimentar. Por exemplo, as lesões hipotalâmicas têm efeitos diferentes sobre a alimentação em machos e fêmeas. Exerce variações nas preferências de gosto e nas respostas a fatores alimentares como dieta com elevado teor de gordura, jejum e atividade de leptina. (FUKUSHIMA; HAGIWARA; FUJIOKA; KIMURA; AKEMA; FUNABASHI, 2015)

Em roedores, a duração das refeições é menor em fêmeas, mas a frequência delas não varia. Os efeitos dos hormônios esteroides se manifestam no tamanho dos animais; os machos são maiores por conta da testosterona, enquanto que o estrógeno reduz a alimentação mediante sua ação no hipotálamo ventromedial (FUKUSHIMA; HAGIWARA; FUJIOKA; KIMURA; AKEMA; FUNABASHI, 2015). Além disso, exerce uma redução no tamanho corporal e no consumo alimentar quando os efeitos do estrógeno e da progesterona são grandes. Tanto camundongos como ratos machos são mais susceptíveis à obesidade induzida experimentalmente mediante dieta com alto teor de gordura. Por outro lado, quanto à resposta ao jejum prolongado, as ratas fêmeas têm um aumento maior na ingestão durante as primeiras 24 horas, com níveis mais altos de grelina em comparação aos machos e uma maior incidência de alimentação de rebote nas fêmeas (FUKUSHIMA; HAGIWARA; FUJIOKA; KIMURA; AKEMA; FUNABASHI, 2015). Essas diferenças estão presentes em humanos também. A anorexia nervosa se expressa mais em mulheres e, tanto os comportamentos alimentares como a configuração do hipotálamo, variam de forma semelhante à variação que ocorre nos ratos. (FUKUSHIMA; HAGIWARA; FUJIOKA; KIMURA; AKEMA; FUNABASHI, 2015)

Quanto às diferenças na neurotransmissão, tanto ratos machos como fêmeas mostraram um aumento na porcentagem de neurônios de Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) após um jejum de 48h, mas nas fêmeas a injeção de glicose reduz mais rapidamente esse aumento em comparação aos machos. A importância desses neurônios está nos efeitos orexígenos deles. Além disso, no jejum também aumenta a quantidade de neurônios com CREB fosforilado, mas isso acontece só em fêmeas. Ademais, foi demonstrada uma atenuação dessa expressão após injeção de glicose. No decorrer da alimentação normal, essa expressão de fosforilação CREB acontece só em neurônios MCH mas não nos de orexina. Novamente, a diminuição rápida da fosforilação acontece só em fêmeas. (FUKUSHIMA; HAGIWARA; FUJIOKA; KIMURA; AKEMA; FUNABASHI, 2015) Tudo isso aponta para uma maior susceptibilidade do hipotálamo a sinais metabólicas em fêmeas.

Todos esses mecanismos que regulam o comportamento alimentar podem mudar a depender de uma variedade de variáveis e fatores internos e externos. Um desses fatores é a ansiedade, da qual se fará um breve relato a seguir.

2.4 ANSIEDADE

O transtorno de ansiedade é um distúrbio em que os dias de ansiedade excessiva e preocupação com uma série de eventos ou atividades são mais frequentes do que os dias sem a ansiedade excessiva por, pelo menos, 6 meses, acompanhados por uma série de sintomas somáticos e a dificuldade do paciente de controlar a preocupação (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Os pesquisadores desenvolveram modelos animais que reproduzem aspectos dessa condição humana, buscando encontrar as seguintes validades: a validade aparente (ou “de face”) correlacionando mudanças fisiológicas com mudanças comportamentais, a validade de construto, buscando encontrar etiologias claras e a validade preditiva por meio de respostas a intervenções farmacológicas (CAMPOS; FOGAÇA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2013).

No entanto, devido às grandes diferenças cognitivas entre humanos e roedores, os modelos animais não conseguem replicar todas as características das doenças psiquiátricas, como o Transtorno de ansiedade, e sim impor um estado de apreensão no animal com parâmetros fisiológicos e comportamentais mensuráveis (LISTER, 1990). Dessa forma, quando se refere aos correlatos animais da

ansiedade em humanos, eles são chamados de comportamentos ansiosos ou comportamentos semelhantes à ansiedade.

Em termos de circuitos neurais, os comportamentos ansiosos são integrados pela amígdala basolateral (BLA). As regiões corticais talâmica e auditiva enviam dados sensoriais a essa região e a seus núcleos lateral e basal. A informação contextual vem do hipocampo (MAREN; FANSELOW, 1995). Os comportamentos ansiosos são consolidados devido à ativação do receptor N-Metil-D-aspartato (FANSELOW; KIM; YIPP; OCA, 1994). A partir daí o BLA envia eferências a partir de seu núcleo central para a amígdala central (CeA) e sua subdivisão medial (CeM). As projeções da CeM atingem a substância cinzenta periaquedutal (PAG), que é uma estrutura fundamental na regulação dos comportamentos defensivos (1992).

O córtex pré-frontal medial (mPFC) também desempenha um papel na modulação desse comportamento. Tanto o córtex pré-límbico quanto o infralímbico enviam projeções para a BLA (STROBEL; MAREK; GOOCH; SULLIVAN; SAH, 2015). Essas áreas desempenham funções opostas na expressão do medo após o aprendizado de extinção (SENN; WOLFF; HERRY; GRENIER; EHRLICH; GRÜNDEMANN; FADOK; MÜLLER; LETZKUS; LÜTHI, 2014). O fator de liberação de corticotrofina está associado a traços de ansiedade em ratos quando injetados no núcleo leito da estria terminal dorsolateral, uma estrutura do prosencéfalo com amplas conexões com a amígdala. (POMRENZE; TOVAR-DIAZ; BLASIO; MAIYA; GIOVANETTI; LEI; MORIKAWA; HOPF; MESSING, 2019) (SAHUQUE; KULLBERG; MCGEEHAN; KINDER; HICKS; BLANTON; JANAK; OLIVE, 2006). Projeções CRF desde a CeA até o núcleo leito da estria terminal dorsolateral regulam comportamentos ansiosos. O bloqueio desses receptores aumenta o tempo passado nos braços abertos e o número de entradas neles no Labirinto em Cruz Elevado, além do tempo no centro do teste de campo aberto. (POMRENZE; TOVAR-DIAZ; BLASIO; MAIYA; GIOVANETTI; LEI; MORIKAWA; HOPF; MESSING, 2019) Adicionalmente, injeções intracerebrais de CRF no núcleo leito da estria terminal dorsolateral tiveram um efeito anorexígeno marcado. (CICCOCIOPPO; FEDELI; ECONOMIDOU; POLICANI; WEISS; MASSI, 2003) Isso foi mediado por agonismo dos receptores CRF1 presentes nessa área anatômica. (SAHUQUE; KULLBERG; MCGEEHAN; KINDER; HICKS; BLANTON; JANAK; OLIVE, 2006)

A ansiedade, muitas vezes, é induzida por eventos traumáticos na vida precoce. Uma variedade de modelos experimentais tem a capacidade de gerá-la em ratos. Entre eles tem-se o DP, como será apresentado a seguir.

2.5 DESMAME PRECOCE E SEUS EFEITOS

2.5.1 Comportamento alimentar

A amamentação mais duradoura, juntamente com outros fatores dietéticos, como o uso de alimentos caseiros, promovem a adesão a dietas mais saudáveis e de acordo com as “diretrizes” preconizadas por órgãos oficiais, em humanos (LIORET; BETOKO; FORHAN; CHARLES; HEUDE; LAUZON-GUILLAIN, 2015). Isso se deve, em parte, à “transferência de sabor” de diversos compostos biológicos presentes em diferentes alimentos por meio do leite materno (MENNELLA, 2009). Esta propriedade permite que a amamentação ative os mecanismos envolvidos no condicionamento da preferência alimentar. Esses mecanismos são a exposição repetida e variada (MAIER; CHABANET; SCHAAL; LEATHWOOD; ISSANCHOU, 2008) e o condicionamento associativo devido à coexistência de sabores aceitos e novos. (FORESTELL; MENNELLA, 2007). Um aumento na aceitação de novos sabores graças à amamentação ainda está presente aos 3 e 6 anos de idade (MAIER-NÖTH; SCHAAL; LEATHWOOD; ISSANCHOU, 2016). Esta mesma aceitação do sabor novo se traduz em aumento do consumo de vegetais (SOLDATELI; VIGO; GIUGLIANI, 2016).

A importância desta maleabilidade nas preferências alimentares vem à tona quando se considera que as preferências de sabor inatas de uma criança tendem para o doce e picante (STEINER, 1979) e, eventualmente, para o salgado (BEAUCHAMP; COWART; MORAN, 1986). Além disso, bebês amamentados consomem volumes menores em comparação com os bebês alimentados com fórmula (HEINIG; NOMMSEN; PEERSON; LONNERDAL; DEWEY, 1993) e são menos propensos a apresentar ganho de peso rápido (MIHRSHAHI; BATTISTUTTA; MAGAREY; DANIELS, 2011). Todos esses fatores constituem a ação potencial da amamentação como um fator de proteção contra o desenvolvimento de obesidade em humanos.

Nos roedores tem sido documentada uma variedade de efeitos do DP. Ratos machos submetidos a ele apresentam um peso corporal menor nos 21 dias e maior

nos 180 dias, além de hiperfagia persistente. Junto com isso os ratos DP demonstram hipoleptinemia e hiperleptinemia, nesses respectivos prazos. (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011)

Estudos mostram que a lactação tem um impacto semelhante nos hábitos alimentares dos ratos. O DP resulta em aumento da ingestão de alimentos palatáveis em ratos adultos (DOS SANTOS OLIVEIRA; LIMA; DA SILVA; DA SILVA; SOUZA; MANHÃES-DE-CASTRO, 2011) e ponto de saciedade retardado durante a alimentação (OLIVEIRA; DA SILVA; DA SILVA; MAGALHÃES; SOUZA; CASTRO, 2011). Também tem um impacto no peso das ratas jovens, uma vez que as ratas submetidas ao desmame precoce aumentaram o peso em comparação com as ratas desmamadas em uma idade adequada (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020). Ratas DP apresentam maior massa de gordura visceral e menor secreção de insulina das ilhotas pancreáticas do que suas controles, desmamadas adequadamente (PIETROBON; MIRANDA; BERTASSO; MATHIAS; BONFLEUR; BALBO; REIS; LATORRACA; ARANTES; OLIVEIRA; LISBOA; MOURA, 2020).

Ratos machos submetidos ao DP apresentaram aumento na expressão do Transportador de serotonina (SERT) e no receptor dopaminérgico D1 (DRD1) no hipotálamo e expressão de SERT, DRD1, DRD2, 5HT-1b e 5HT-1c (renomeado como 5HT-2c) no tronco cerebral. Isso é importante porque os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico regulam diretamente a alimentação hedônica e homeostática (TAVARES; DO AMARAL ALMEIDA; SOUZA; FARIAS; SOUZA; ANDRADE SILVA; LAGRANHA; KAEFFER; SOUZA, 2020).

2.5.2 Ansiedade e resposta neuroendócrina ao estresse

Existem informações contraditórias sobre as avaliações clássicas de comportamentos ansiosos em ratos desmamados. Alguns estudos não demonstram nenhuma diferença entre fêmeas DP e as desmamadas normalmente quanto à análise do labirinto em cruz elevado, testes de campo aberto e respostas autonômicas a intrusos (ITO; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2006; TAKITA; KIKUSUI, 2016). Outros mostram que ratos DP de ambos os sexos entraram menos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e passaram menos tempo nesses braços, reduziram a frequência e a duração do comportamento de mergulho da cabeça no teste de *hole-board* e passaram menos tempo no quadrado central do

teste de campo aberto (KANARI; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2005). Ademais, machos DP entraram menos vezes e passaram mais tempo nos braços fechados que as fêmeas DP mesmo que ambos os sexos mostrassem os mesmos resultados em comparação aos controles. (SHIMOZURU; KODAMA; IWASA; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2007)

O DP, junto com estresse crônico imprevisível, induziu atividade desequilibrada na amígdala basolateral junto com latências mais longas do córtex pré-frontal medial direito após a estimulação da amígdala basolateral direita em ratos de ambos os sexos (ISHIKAWA; NISHIMURA; ISHIKAWA, 2015). Além disso, ratos machos DP demonstram mais dopamina na amígdala ao serem confrontados com um ambiente novo (prova do campo aberto). (TAKITA; KIKUSUI, 2020) Isso é importante pois esta via específica e a amígdala em geral têm uma função crucial na regulação e processamento das emoções e da recompensa. Seu desenvolvimento muda devido ao estresse e trauma no início da vida; por exemplo, crianças que foram expostas à depressão materna crônica e cuidados institucionais têm um volume da amígdala aumentado (TOTTENHAM; HARE; QUINN; MCCARRY; NURSE; GILHOOLY; MILLNER; GALVAN; DAVIDSON; EIGSTI; THOMAS; FREED; BOOMA; GUNNAR; ALTEMUS; ARONSON; CASEY, 2010; LUPIEN; PARENT; EVANS; TREMBLAY; ZELAZO; CORBO; PRUESSNER; SÉGUIN, 2011).

O cortisol e seus efeitos sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal são fundamentais para as expressões clínicas da ansiedade. Em leitões, a concentração sérica de cortisol e o aumento da transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de cortisol são inversamente proporcionais à idade de desmame (LI; YANG; LI; LV; XIE; DU; JIN; QIN; JIAO, 2016). Em camundongos DP machos, mas não em fêmeas, os níveis séricos de corticosterona são mais altos às 3 semanas de vida mas menores às 8 semanas comparado aos seus homólogos desmamados adequadamente. (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). Enquanto, tanto fêmeas como machos mostram níveis mais elevados de corticosterona 48 horas depois do DP. (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009)

Além disso, a perda de caseína dietética secundária ao desmame resulta na ativação de uma população de receptores opioides delta localizados principalmente no córtex somatossensorial (KITCHEN; LESLIE; KELLY; BARNES; CROOK; HILL; BORSODI; TOTH; MELCHIORRI; NEGRI, 1995), demonstrando a importância da

caseína no desenvolvimento e a participação do sistema opioidérgico nas adaptações decorrentes do desmame precoce.

2.5.3 Desenvolvimento neural

Têm sido documentadas diferenças relacionadas ao sexo nos efeitos do desmame precoce sobre o desenvolvimento do sistema nervoso, principalmente em camundongos. Em camundongos submetidos ao desmame precoce, os machos mostram maiores níveis basais de corticosterona nas 8 semanas de vida (KIKUSUI; NAKAMURA; KAKUMA; MORI, 2006), redução no número de proteínas básicas da mielina (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007) e acúmulo de galactosilceramida na amígdala mas não no hipocampo nem no córtex pré-frontal na quinta semana de vida. Junto com isso, observou-se um aumento no número de axônios mielinizados, mas uma diminuição no diâmetro das bainhas de mielina na parte anterior da amígdala basolateral, o que aponta para uma mielinização precoce (ONO; KIKUSUI; SASAKI; ICHIKAWA; MORI; MURAKAMI-MUROFUSHI, 2008).

Adicionalmente, o DP tem efeitos sobre a neurogênese hipocampal e a expressão de fatores neurotróficos como o BDNF em camundongos. Machos DP demonstraram menores quantidades de células imunorreativas BrdU no giro denteado às 3, 5 e 8 semanas de idade, enquanto as fêmeas só demonstraram essa queda às 5 semanas. Adicionalmente, os machos DP expressaram menos proteína BDNF às 3 semanas de idade em relação aos camundongos desmamados normalmente. Esses efeitos mostraram dimorfismo sexual, enquanto que a marcação dupla com BrdU e os marcadores neurais NeuN e Tuj1 demonstrou uma neurogênese menor em camundongos DP às 5 semanas de idade em ambos os sexos. (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009)

2.5.4 Comportamento materno

A quantidade de atenção materna recebida durante a infância influi diretamente sobre o comportamento materno das ratas na idade adulta. O DP diminui a construção de ninhos e a aceitação de filhotes adotivos. Em camundongos fêmeas DP há uma diminuição no asseio aos filhotes. (KIKUSUI; MORI, 2009) Todos esses achados demonstram que ratas DP têm uma queda na qualidade e quantidade do cuidado materno, a qual se replica na geração subsequente.

2.5.5 Diferenças relacionadas ao sexo nos efeitos do DP

Os efeitos do DP sobre a ansiedade e a resposta ao estresse na vida adulta nos roedores variam de acordo com o gênero. Os ratos e camundongos machos são mais vulneráveis ao estresse de DP que as fêmeas. Em ratos DP se observam comportamentos ansiosos no labirinto em cruz elevado e respostas autonômicas mais claramente marcadas em comparação às fêmeas. (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007; KIKUSUI; NAKAMURA; KAKUMA; MORI, 2006; ITO; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2006) Além disso, há os efeitos dimórficos sobre a neurogênese hipocampal previamente comentados. Dada esta diferença relacionada ao sexo, torna-se importante desvendar o papel que os hormônios sexuais têm sobre essas diferenças.

2.6 ESTRESSE

O estresse pode ser pensado como a alavanca através da qual os agentes, internos e externos, podem trazer o caos ao delicado equilíbrio do organismo. Às vezes, os efeitos que esse caos provoca são prontamente resolvidos, mas, como será visto ao longo desta revisão, outras vezes, consequências duradouras podem ser provocadas e, até mesmo, reforçadas pela existência de estresse. Isso é especialmente verdadeiro quando se está sujeito a estresse durante os primeiros estágios do desenvolvimento. É nessa janela temporal, quando o organismo está estabelecendo e organizando os processos e caminhos que o ajudarão a atingir a homeostase, que a ação do estresse em estabelecer um sentido alterado de "normal" atinge o seu ápice. Isso é particularmente relevante quando se refere ao desenvolvimento totalmente complexo do sistema nervoso central e à miríade de processos comportamentais que ele regula, como o comportamento alimentar. Aqui fica claro como as condições em que ocorre o desenvolvimento podem moldar esses comportamentos e seus substratos neuroanatômicos subjacentes.

Como tal, serão examinados alguns dos mecanismos básicos pelos quais esse estresse externo pode incidir sobre o funcionamento interno do organismo. Além disso, serão abordados alguns modelos animais que os pesquisadores desenvolveram para obter uma melhor compreensão desses processos, com ênfase especial no estresse alimentar.

O endocrinologista Hans Selye definiu o termo "estresse" como um elemento comum a todas as doenças que causam modificações observáveis e mensuráveis

na estrutura e composição química do corpo (FILGUEIRAS; HIPPERT, 1999). Walter B. Cannon foi o primeiro a falar sobre o estresse psicológico ao introduzir o conceito de “luta ou fuga” (ROM; REZNICK, 2016). O termo estresse evoluiu ao longo dos anos e, atualmente, o estresse pode ser definido como um estado em que estressores intrínsecos ou extrínsecos ameaçam a homeostase e o corpo responde com um repertório fisiológico e comportamental complexo para manter ou restabelecer o equilíbrio original do corpo (TSIGOS; KYROU; KASSI; CHROUSOS, 2000).. Essa resposta biológica começa a enviar informações relacionadas ao agente estressor para o as áreas cerebrais de todos os principais sistemas sensoriais (YILMAZ; MEISTER, 2013). Então, o cérebro recruta os efetores responsáveis pela geração da resposta fisiológica ao estresse. A resposta imediata é neural e realizada pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA). O SNA muda rapidamente a fisiologia por meio da inervação dos órgãos-alvo (GAO; ZHUANG; LI; LI; CHEN; WANG; ZHU, 2016). Sua ativação também diminui rapidamente, resultando em respostas de curta duração. A última resposta é neuroendócrina e é realizada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA). A ativação do eixo HPA aumenta os glicocorticóides circulantes (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) gerando um episódio de secreção prolongado e amplificado (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

2.6.1 Estresse na vida precoce

Essa resposta ao estresse arriba descrita ocorre em organismos já desenvolvidos. Por outro lado, durante o desenvolvimento, essa resposta ao estresse tem-se algumas peculiaridades e, portanto, essa resposta deve ser diferenciada pelo termo “estresse no início da vida” para indicar que, durante este período de desenvolvimento, as adaptações ao agente estressor ocorrem de forma diferente do adulto. As estruturas anatômicas do eixo HPA aparecem no início do desenvolvimento; entretanto, a resposta ao estressor é atenuada, por isso esse período é denominado de *Stress Hyporesponsive Period* (SHRP) (LUPIEN; MCEWEN; GUNNAR; HEIM, 2009). Em roedores, corresponde às duas primeiras semanas de vida (LEVINE, 1994). No SHRP, os níveis basais de glicocorticóides estão abaixo dos níveis normais e mesmo a exposição ao éter, manipulação, calor, choque elétrico, cirurgia ou frio aumenta os níveis hormonais discretamente

(LUPIEN; MCEWEN; GUNNAR; HEIM, 2009). Isso não significa que no início da vida o organismo não seja capaz de experimentar o estresse, mas sim que a resposta é atenuada.

Os modelos de estresse na infância incluem tratamentos tóxicos – como álcool - ou farmacológicos - como o ácido valpróico - administrados a mães durante a gravidez. Outros modelos incluem estresse psicológico em mulheres grávidas, por exemplo, para fazer com que elas se comuniquem, durante a separação, com outra rata que recebeu choques elétricos. A restrição da alimentação é outro tipo de estressor que resulta na redução do crescimento fetal. Além disso, em roedores, a separação diária das mães e de suas ninhadas por algumas horas durante as duas primeiras semanas de vida pode ativar o eixo HPA aumentando os níveis de glicocorticoides (HUOT; PLOTSKY; LENOX; MCNAMARA, 2002) e outros intermediários do eixo HPA, como o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH). (LUPIEN; MCEWEN; GUNNAR; HEIM, 2009). Este modelo é chamado de separação materna e tem sido amplamente usado para imitar o estresse da infância em humanos, embora em humanos os estressores sejam mais diversos e incluam abuso emocional, negligência emocional, abuso físico, negligência física e abuso sexual . (MURTHY; GOULD, 2018). Finalmente, o desmame precoce resulta num aumento de células mucosas do pescoço e pepsinogênio C em ratos, evidenciando um aumento de corticosterona neles. (ZULIAN; HOSOYA; FIGUEIREDO; OGIAS; OSAKI; GAMA, 2017)

2.6.2 Estresse na vida precoce e desordens comportamentais

Em humanos, o estresse no início da vida tem sido associado a doenças na idade adulta. Foi demonstrado que diferentes tipos de abuso - tais como conflitos sexuais e emocionais - e conflitos familiares estão associados ao Transtorno De Depressão Maior na velhice (SALEH; POTTER; MCQUOID; BOYD; TURNER; MACFALL; TAYLOR, 2017). Traumas e baixo nível socioeconômico durante a infância previram aumento da ansiedade por volta dos 85 anos de idade (LÄHDEPURO; SAVOLAINEN; LAHTI-PULKKINEN; ERIKSSON; LAHTI; TUOVINEN; KAJANTIE; PESONEN; HEINONEN; RÄIKKÖNEN, 2019). Um estudo com adolescentes entre 12 e 15 anos mostrou que o trauma na infância estava

associado a distúrbios no sono e sua regularidade (poucas horas de sono, dificuldade para adormecer, pesadelos, etc.) (BADDAM; OLVERA; CANAPARI; CROWLEY; WILLIAMSON, 2019). Esses achados demonstram que o estresse no início da vida tem um papel fundamental no aparecimento e evolução de patologias que envolvem distúrbios comportamentais como manifestação clínica.

Os distúrbios do comportamento alimentar são outra característica associada ao estresse no início da vida. Um estudo com mulheres jovens (10-26 anos) que experimentaram a perda de um dos pais ou irmãos nos primeiros 10 anos de vida ou que nasceram de mães que perderam um parente próximo 1 ano antes ou durante a gravidez, mostrou que este grupo tem um maior risco de bulimia nervosa e bulimia com anorexia (SU; LIANG; YUAN; OLSEN; CNATTINGIUS; LI, 2016). Em uma amostra de 36.309 pessoas, todos os tipos de maus-tratos infantis, como castigo físico, abuso físico, abuso sexual, negligência emocional, negligência física e exposição à violência pelo parceiro íntimo foram associados à Anorexia Nervosa, Bulimia Nervosa e Transtorno de Compulsão Alimentar (AFIFI; SAREEN; FORTIER; TAILLIEU; TURNER; CHEUNG; HENRIKSEN, 2017). Juntos, esses resultados sugerem que os estressores precoces podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de resultados psicológicos e de saúde ruins mais tarde na vida.

Padrões de comportamento alimentar alterados também foram demonstrados em estudos com animais. Roedores estressados pela separação materna diária durante a lactação mostraram um ponto de saciedade mais precoce (DA SILVA; SOUZA; DOS SANTOS; PINHEIRO; BORBA; DA SILVA; CASTRO; SOUZA, 2014), maior ingestão de dieta palatável (SOUZA; DA SILVA; MATOS; DO AMARAL ALMEIDA; BELTRÃO; SOUZA; CASTRO; SOUZA, 2018), maior preferência por solução de sacarose (MICHAELS; HOLTZMAN, 2007) e maior ingestão de dieta padrão após exposição a ciclos alternados de jejum e alimentação (RYU; YOO; KANG; LEE; JAHNG, 2009). Além disso, a separação materna altera os circuitos cerebrais que regulam o comportamento alimentar (SOUZA; DA SILVA; COSTA; MATOS; FARIAS CAMPINA; DO AMARAL ALMEIDA; DA SILVA; CAVALCANTE; TAVARES; SOUZA, 2020; SOUZA; DA SILVA; MATOS; DO AMARAL ALMEIDA; BELTRÃO; SOUZA; CASTRO; SOUZA, 2018). Assim, esses estudos demonstram a associação entre as experiências da infância e a condição de saúde mais tarde na vida, e apontam para o provável mecanismo pelo qual o estresse no início da vida pode predispor o organismo ao desenvolvimento de distúrbios do comportamento

alimentar, ou seja, modificação da função dos circuitos neurais que regulam o comportamento alimentar. Portanto, no presente trabalho será investigado a influência de uma condição adversa no início da vida, a saber, o desmame precoce, associado a outra experiência adversa após o desmame, a saber, o estresse alimentar, sobre parâmetros comportamentais em ratas adultas.

3 HIPÓTESE

A exposição aguda e crônica ao estresse alimentar aumenta o comportamento semelhante à ansiedade e promove aumento na ingestão em fêmeas adultas que foram desmamadas precocemente.

4 OBJETIVOS

4.5 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição ao estresse alimentar na infância e vida adulta sobre o comportamento semelhante à ansiedade e parâmetros do comportamento alimentar em fêmeas adultas que foram desmamadas precocemente.

4.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em ratas adultas, submetidas ou não ao desmame precoce, expostas aguda ou cronicamente ao estresse alimentar na vida adulta, avaliar:

- O peso corporal;
- O comportamento semelhante à ansiedade no labirinto em cruz elevado;
- O consumo de alimento palatável;
- O consumo de dieta padrão;
- O consumo de água.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.5 ANIMAIS

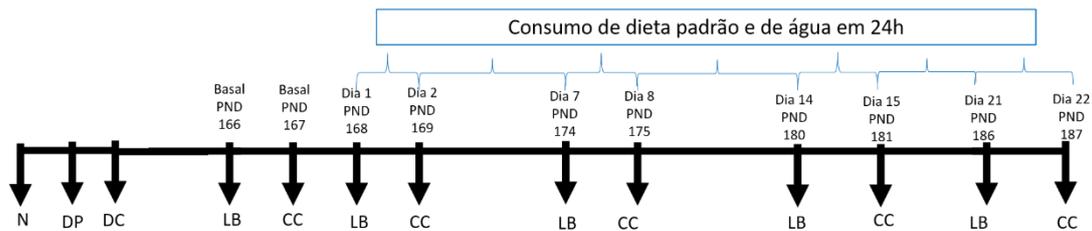
Foram utilizadas ratas albinas da linhagem Wistar em idade reprodutiva com aproximadamente 200-250 g de peso corporal, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As ratas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. A gestação foi confirmada pela verificação da alteração de peso corporal. Quando confirmada a gestação, as ratas foram transferidas para gaiolas individuais e, durante a gestação e lactação, receberam dieta padrão de biotério (Labina, Presence ®). Após o nascimento dos filhotes, foi realizado o procedimento de sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes por mãe, com filhotes machos e fêmeas, na mesma proporção (4:4) sempre que possível. Foram utilizadas 2 filhotes fêmeas por ninhada, escolhidas de forma aleatória para a formação dos grupos experimentais. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições padrão de biotério, com temperatura de 22°C(± 1), sob ciclo claro-escuro invertido de 12-12h (com luzes acesas às 18h) e livre acesso à água e dieta padrão do biotério. O manejo e os cuidados seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco, processo 0020/2018.

5.6 DESMAME PRECOCE E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram delineados de acordo com a presença ou não do desmame precoce. Este consistiu da separação precoce entre mães e filhotes, de forma permanente, a partir do 15º dia pós-natal. Sendo os animais controles desmamados no 30º dia pós-natal. Os filhotes desmamados precocemente receberam dieta padrão de biotério triturada até o dia 21 de vida. A partir do 21º dia de vida, todos os grupos receberam a dieta padrão de biotério em forma de pellets. Foram, assim, formados os grupos desmame precoce e controle. Após o desmame, apenas fêmeas foram utilizadas neste estudo. Elas foram agrupadas em gaiolas separadas com dois animais por gaiola até o início dos experimentos, por volta dos 170 dias de vida. Cada subgrupo foi composto de um total de 8 animais. Assim, foram constituídos os seguintes grupos experimentais:

- Grupo Controle - desmamado no período natural para a espécie (30° dia pós-natal, n=8);
- Grupo desmamado precocemente – animais desmamados no 15° dia pós-natal (n=8).

Desenho experimental



Em que:

N: Nascimento

DP: Desmame precoce

DC: Desmame controle

LB: Labirinto

CC: Consumo de Cookie

5.7 ESTRESSE ALIMENTAR E CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL ANTES E APÓS ESTRESSE

Na idade entre 166 e 168 dias de vida, entre 12h00 e 12h20, iniciou-se o estresse alimentar. Este consistiu da exposição visual e olfativa do animal a alimento palatável (Cookies de chocolate Bauducco®) por vinte minutos, por 22 dias consecutivos. O alimento foi envolto em tela galvanizada (15cmx15cm) que não permitiu o consumo por parte do animal. Foram realizadas análises do consumo em cinco momentos distintos: o basal (sem estresse alimentar), no 2º dia, no 8º dia, no 15º dia e no 22º dia de estresse alimentar. Para o consumo basal, os animais não foram expostos ao alimento palatável envolto na tela galvanizada, apenas puderam ingeri-lo num período de 1h. Nos dias de estresse, após os vinte minutos de estresse alimentar, os animais tiveram acesso ao Cookie durante o período de 1h. A ingestão alimentar (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada. Durante o período deste experimento, os animais tiveram livre acesso à água e dieta padrão.

5.8 PESO CORPORAL

O peso corporal foi avaliado no início do experimento e, semanalmente, nos dias 2, 8, 15 e 22 de estresse alimentar. Foi utilizada balança digital com sensibilidade de 0,001g.

5.9 ANSIEDADE EXPERIMENTAL ANTES E APÓS ESTRESSE ALIMENTAR

O teste para avaliação da ansiedade foi realizado através do modelo do labirinto em cruz elevado. Este modelo de teste dura 5 minutos e é realizado no labirinto, o qual é constituído de dois braços abertos (50 x 10cm) e dois braços fechados (50 x10x 40 cm) que se estendem a partir de uma plataforma central comum (10x10cm), elevados a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso. O revestimento do piso, das paredes dos braços e região central do labirinto é de material antiderrapante e escuro. Durante o teste, o labirinto foi iluminado com luz vermelha de baixa voltagem (15 W). Este modelo experimental foi baseado no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados. A realização do teste consistiu em colocar os animais, individualmente, no espaço central do aparelho, com a cabeça voltada para o braço aberto oposto ao avaliador e registrar os dados durante 5 minutos. Foram registrados em protocolo o tempo de permanência e o número de entradas em cada um dos quatro braços. O registro de cada entrada apenas teve validade a partir do momento em que o animal encontrou-se com as 4 patas em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado utilizando-se um cronômetro digital. O tempo de permanência na plataforma central foi dado pela seguinte fórmula: $TC = TT - (TBF + TBA)$, onde TC é o tempo na plataforma central, TT é o tempo total do teste, TBF é o tempo no braço fechado e TBA é o tempo no braço aberto.

Utilizando o labirinto em cruz elevado, a ansiedade experimental foi avaliada em nível basal e em resposta ao estresse em quatro momentos distintos do período de 22 dias do estresse alimentar, a saber: no 1º dia, no 7º dia, no 14º dia e no 21º dia. Apenas nesses dias, após vinte minutos de estresse alimentar, os animais foram testados no labirinto em cruz elevado durante 5 minutos. O período de testes foi das 12h00 às 15h00.

5.10 CONSUMO DE DIETA PADRÃO APÓS ESTRESSE ALIMENTAR

Durante os 22 dias de estresse alimentar, o consumo de dieta padrão (ração Presence Ratos e Camundongos Extrusado) foi mensurado a cada 24h. Foram ofertados 50g de dieta padrão após o período de 20 minutos do estresse alimentar e, após 24h, o rejeito foi pesado. Esse procedimento foi repetido até o final do período de estresse alimentar, ou seja, até o 22º dia. A ingestão alimentar (g) foi quantificada através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada.

5.11 CONSUMO DE ÁGUA APÓS ESTRESSE ALIMENTAR

Durante os 22 dias de estresse alimentar, o consumo de água foi mensurado a cada 24h. Foram ofertadas garrafas cheias de água com o peso de aproximadamente 900g. A garrafa foi pesada após o período de 20 minutos do estresse alimentar e, após 24h, a garrafa foi pesada novamente. Esse procedimento foi repetido até o final do período de estresse alimentar, ou seja, até o 22º dia. O consumo de água foi quantificado através da diferença entre a quota oferecida e a quota rejeitada em gramas de peso da garrafa.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os Dados foram apresentados como média e desvio padrão. Foram utilizadas a análise de variância ANOVA Two-Way e o Teste t. Em todas as avaliações, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 5, versão 5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.5 PESO CORPORAL

Não houve diferença entre os pesos corporais do grupo controle e desmamados nas idades avaliadas (Figura 1).

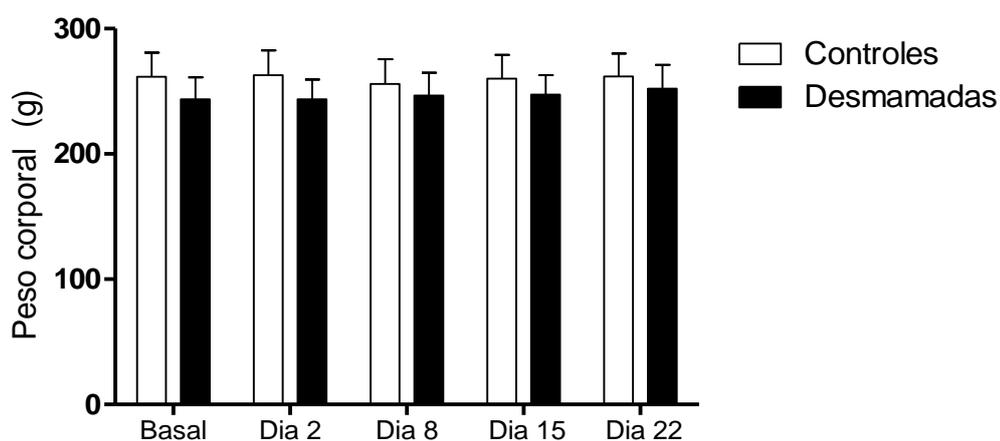


Figura 1. Efeito do desmame precoce associado ao estresse crônico sobre o peso corporal em ratas adultas. O peso corporal foi obtido com animais entre 166-168 dias de vida (análise basal) e nos dias 2 (169-171 dias de vida), 8 (175-177 dias de vida) 15 (182-184 dias de vida) e 22 (188-190 dias de vida) de estresse alimentar. ANOVA Two-Way. Pós- teste de *Bonferroni*. n=8. Dados expressos em média ± DP.

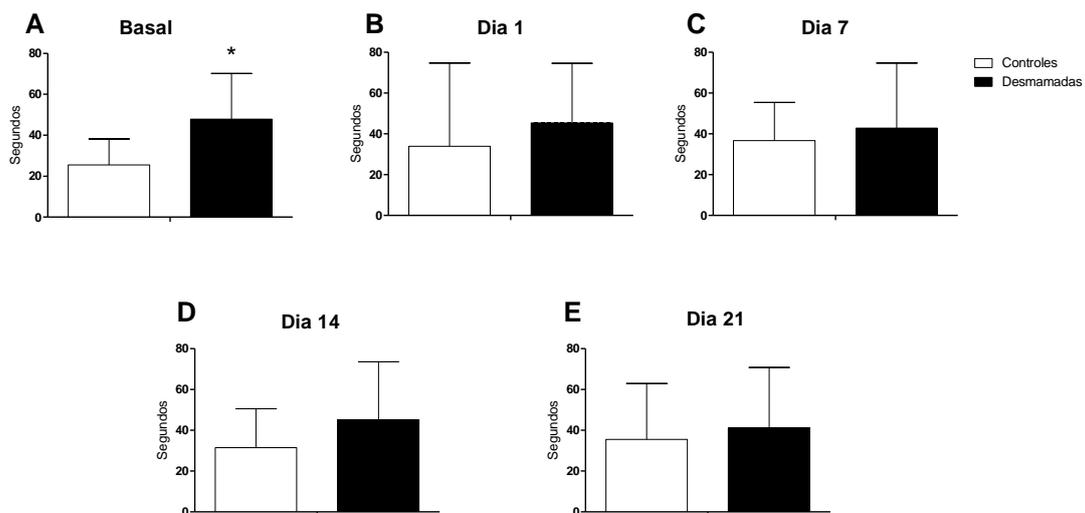
Día	Control	DP	p-valor
Basal	261,6 ± 19,2	243,6 ± 17,4	p>0,05
Día 2	262,7 ± 19,9	243,6 ± 15,7	p>0,05
Dia 8	255,9 ± 19,7	246,7 ± 18,2	p>0,05
Dia 15	260 ± 19,1	247,5 ± 15,4	p>0,05
Dia 22	261,9 ± 18,2	252 ± 19	p>0,05

Tabela 1. Peso médio (g) e desvio padrão das ratas de acordo aos dias de avaliação

6.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Não houve diferenças entre o tempo de permanência em cada um dos braços aberto ou fechados, entre o grupo controle e desmamado. No entanto, a análise do tempo de permanência na plataforma central do labirinto mostrou que os animais desmamados permanecem mais tempo no centro no dia da análise basal, sem a exposição ao estresse alimentar (Controle: $25,5 \pm 12,7$ vs Desmamadas: $47,9 \pm 22,4$, $p < 0,05$) (Figura 2A).

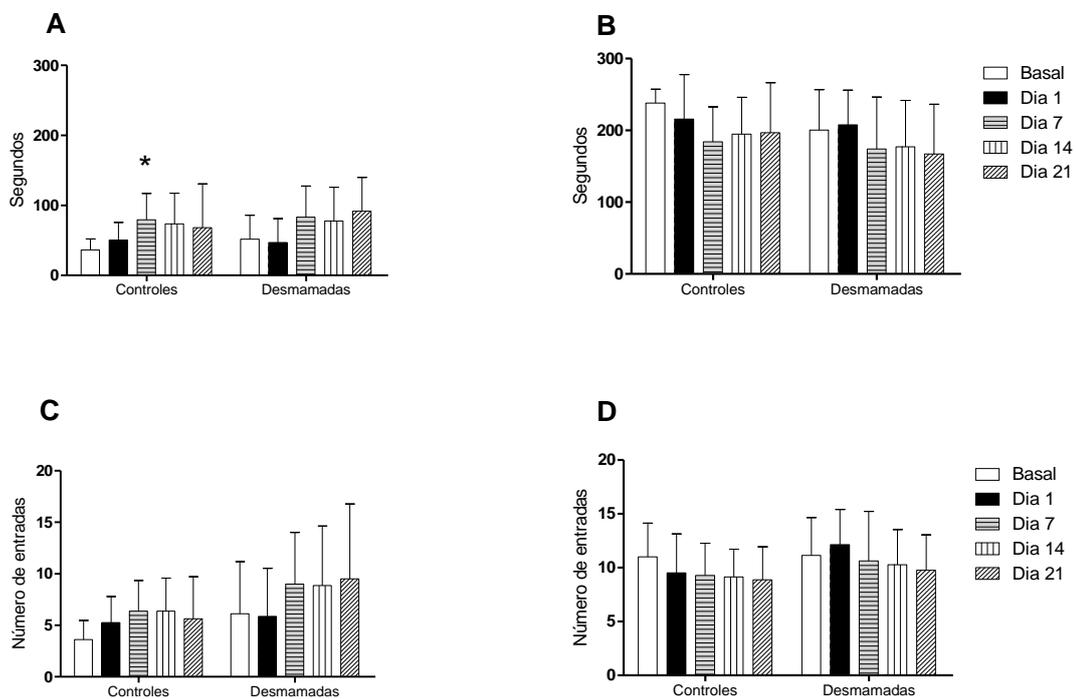
Figura 2 - Efeito do desmame precoce associado ao estresse crônico sobre o tempo de permanência na plataforma central do labirinto em cruz elevado. Os dados foram obtidos com animais entre 166-168 dias de vida (análise basal, Figura 2A) e nos dias 1 (168-170 dias de vida, Figura 2B), 7 (174-176 dias de vida, Figura 2C), 14 (181-183 dias de vida, Figura 2D) e 21 (187-189 dias vida, Figura 2E) de estresse alimentar. Test t. $n=8$. Dados expressos em média \pm DP. * $p < 0,05$



Fonte: o autor(2021)

A análise entre os diferentes dias demonstrou que o grupo controle aumentou o tempo de permanência no braço aberto no dia 7 quando comparado à análise basal (Basal: $36,5 \pm 15,5$ vs Dia 7: $79,2 \pm 38,0$, $p < 0,05$) (Figura 3A). Não houveram diferenças entre o número de entradas em cada um dos quatro braços entre o grupo controle e desmamado nos outros dias (Figura 3 C e 3D).

Figura 3 - Efeito do desmame precoce associado ao estresse crônico sobre o tempo de permanência nos braços abertos e fechados (Figura 3A e 3B respectivamente) e número de entradas nos braços abertos e fechados (Figura 3C e 3D respectivamente) do labirinto em cruz elevado. Os dados foram obtidos com animais entre 166-168 dias de vida (análise basal) e nos dias 1 (168-170 dias de vida), 7 (174-176 dias de vida), 14 (181-183 dias de vida) e 21 (187-189 dias vida) de estresse alimentar. Two-Way ANOVA. Pós-teste de *Bonferroni*. n=8. Dados expressos em média \pm DP. *p<0,05 vs Basal.



Fonte: o autor(2021)

Tabela 2 - Tempo de permanência nos braços abertos médio (seg) e desvio padrão das ratas de acordo aos dias de avaliação

Día	Control	DP	p-valor
Basal	36,5 \pm 15,5	51,9 \pm 34,4	p>0,05
Día 1	50,4 \pm 25,3	47,1 \pm 34	p>0,05
Dia 7	79,2 \pm 38	83,41 \pm 44,5	p>0,05
Dia 14	73,6 \pm 44,1	77,9 \pm 48	p>0,05
Dia 21	68 \pm 62,8	91,7 \pm 48,3	p>0,05

Tabela 3 - Tempo de permanência nos braços fechados médio (seg) e desvio padrão das ratas de acordo aos dias de avaliação

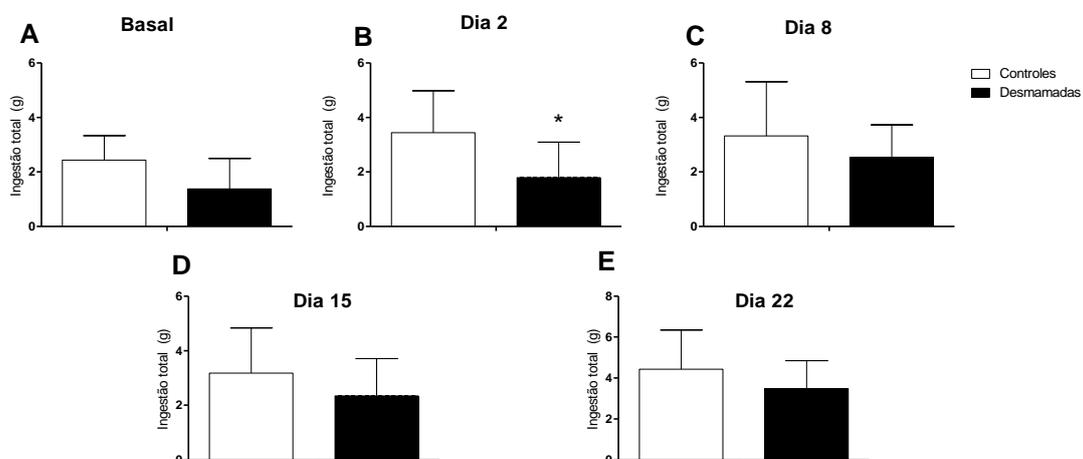
Día	Control	DP	p-valor
Basal	238 ± 19,3	200,2 ± 56,3	p>0,05
Día 1	215,7 ± 61,8	207,5 ± 48,6	p>0,05
Dia 7	184,1 ± 48,7	174,1 ± 72,2	p>0,05
Dia 14	194,9 ± 51	177 ± 64,7	p>0,05
Dia 21	196,5 ± 70	167 ± 69,5	p>0,05

Fonte: o autor(2021)

6.7 CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL

A análise do consumo de cookies de chocolate (Bauducco®) demonstrou aumento da consumo no grupo desmamado após estresse alimentar no dia 2 (Controles: 3,4 ± 1,5 vs Desmamadas: 1,8 ± 1,3, p<0,05) (Figura 4B). Não houve diferenças no consumo entre os grupos na análise basal, nem nos dias 8, 15 ou 22 de estresse alimentar.

Figura 4 - Efeito do desmame precoce associado ao estresse crônico sobre o consumo de cookies de chocolate (Bauducco®). Os dados foram obtidos com animais entre 166-168 dias de vida (análise basal) e nos dias 2 (169-171 dias de vida), 8 (175-177 dias de vida) 15 (182-184 dias de vida) e 22 (188-190 dias de vida) de estresse alimentar. Teste t. n=8. Dados expressos em média ± DP. *p<0,05 vs controles.



Fonte: o autor(2021)

Tabela 4 - Ingestão total de cookies de chocolate média (g) e desvio padrão das ratas de acordo aos dias de avaliação

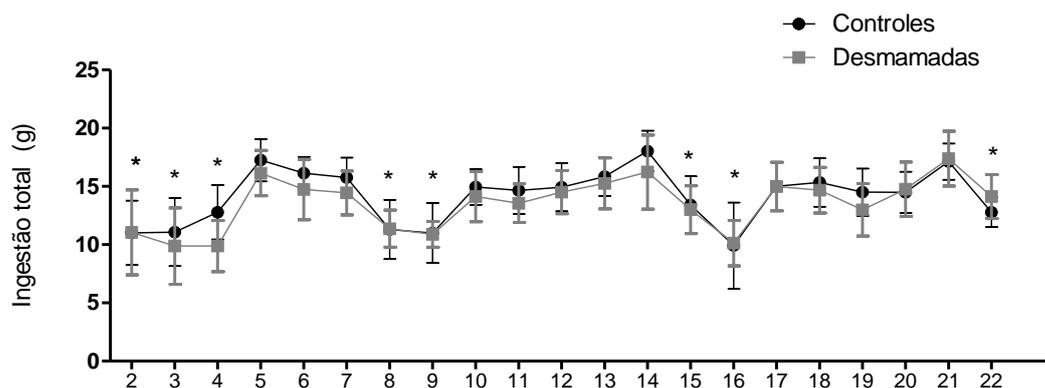
Día	Control	DP	p-valor
Basal	2,4 ± 0,9	1,4 ± 1,1	p>0,05
Día 8	3,3 ± 2	2,5 ± 1,2	p>0,05
Dia 15	3,2 ± 1,6	2,3 ± 1,4	p>0,05
Dia 22	4,4 ± 1,9	3,5 ± 1,4	p>0,05

Fonte: o autor(2021)

6.8 CONSUMO DE DIETA PADRÃO

Não houve diferença no consumo de dieta padrão entre os grupos controle e desmamado em nenhum dos dias avaliados. A análise ao longo dos dias, no entanto, demonstrou que, em ambos os grupos, houve a repetição de um padrão de 2 dias com as menores ingestões seguidos por 5 dias com as maiores ingestões na segunda e terceira semanas dos 22 dias de estresse alimentar.

Figura 5 - Efeito do desmame precoce associado ao estresse crônico sobre o consumo de dieta padrão. Os dados foram obtidos entre os dias 2 e 22 de estresse alimentar a cada 24h. Two-way ANOVA. Pós-teste de *Bonferroni*. n=8. Dados expressos em média ± DP. *Indicam os pontos em que ambos os grupos apresentaram valores estatisticamente menores comparados aos valores maiores.

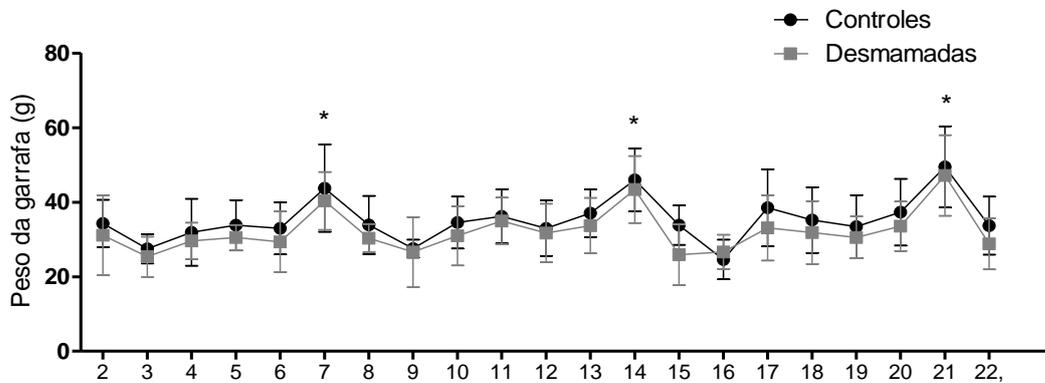


Fonte: o autor(2021)

6.9 CONSUMO DE ÁGUA

Não houve diferença no consumo de água entre os grupos controle e desmamado em nenhum dos dias avaliados. A análise ao longo dos dias, no entanto, demonstrou a ocorrência de um pico de ingestão a cada 7 dias durante os 22 dias estresse alimentar em ambos os grupos, controle e desmamado. 1 g = 1 ml

Figura 6 - Efeito do desmame precoce associado ao estresse crônico sobre o consumo de água. Os dados foram obtidos entre os dias 2 e 7 de estresse alimentar a cada 24h. Two-way ANOVA. Pós-teste de *Bonferroni*. n=8. Dados expressos em média \pm DP. *Indicam os pontos em que ambos os grupos apresentaram valores estatisticamente maiores comparados aos valores menores, ou seja, indicam picos.



7 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os padrões alimentares e ansiosos de ratas Wistar fêmeas que foram desmamadas precocemente. Quando comparadas a fêmeas controle, não apresentaram diferenças no peso corporal. No teste do labirinto em cruz elevado foi observado um maior tempo de permanência na plataforma central em ratas desmamadas precocemente, apenas após a avaliação basal. Quanto ao consumo de alimento palatável, o desmame precoce reduziu o consumo após o estresse agudo, no dia 2. Quanto ao consumo de dieta padrão e de água, não houve efeito relacionado ao desmame precoce.

O desmame precoce (DP) é um procedimento que permite avaliar o efeito da ausência do leite materno na dieta, e do cuidado materno, durante um momento crítico do desenvolvimento do mamífero, o período neonatal. Nos ratos machos, o DP inicialmente resulta em perda de peso no período neonatal mas esse resultado se reverte na idade adulta (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011). Esse efeito aumento de peso na vida adulta é parcialmente mediado pela programação metabólica da leptina, com níveis baixos na infância que condicionam uma resistência à leptina na vida adulta (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011). A leptina age sobre uma variedade de estruturas neuroanatômicas, entre elas o núcleo arqueado do hipotálamo, onde inibe neurônios NPY/AgRp/GABA mediante a ativação de canais de potássio ATP-sensíveis (BAQUERO; SOLIS; LINDSLEY; KIRIGITI; SMITH; COWLEY; ZELTSER; GROVE, 2014).

As ações do estrógeno 2 podem estar envolvidas nas diferenças dos resultados em fêmeas obtidos neste estudo quando comparados aos estudos similares feitos em machos. Em ratos machos submetidos a DP tem sido demonstrado um aumento de peso corporal na idade adulta (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011), somado à resistência a e níveis elevados de leptina (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011). Curiosamente, ao serem submetidos ao DP em conjunto com o estresse alimentar, eles não mostram esse aumento mesmo demonstrando uma ingestão aumentada de dieta padrão e de dieta palatável (TAVARES; DO AMARAL ALMEIDA; SOUZA; FARIAS; SOUZA; ANDRADE SILVA; LAGRANHA; KAEFFER; SOUZA, 2020).

Os estrógenos são um fator crítico para o controle do peso corporal. Tudo indica que a ingestão alimentar é controlada ciclicamente e correlacionada com os níveis de estrógeno (TARTTELIN; GORSKI, 1973; TARTTELIN, 1968). Nos estudos com fêmeas desmamadas precocemente tem se observado um aumento no peso corporal em ratas adolescentes (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020), o que não aconteceu no presente estudo. Isso é possivelmente explicado pelos níveis séricos de estrogênios de acordo com a idade da rata, os quais são menores em ratas jovens (STEGER; PELUSO, 1982). Sabe-se que o menor nível de estrógeno circulante promove um maior peso corporal, como tem sido demonstrado em ratas ovariectomizadas (ASARIAN; GEARY, 2002; WALLEN; BELANGER; WITTNICH, 2001). São clássicos os estudos que relatam o tratamento com estrógeno em fêmeas ovariectomizadas, promovendo redução do peso corporal e do consumo alimentar (WADE, 1975). Pode ser que, no presente estudo, a ausência de mudança de peso tenha se correlacionado com uma ausência de mudança no consumo de dieta padrão, o qual também é influenciado pelos níveis desse hormônio. O estrógeno é importante mediador do balanço energético, diminuindo o consumo alimentar e aumentando o gasto energético (ECKEL; LANGHANS; KAHLER; CAMPFIELD; SMITH; GEARY, 1998). Como o desmame precoce promove ganho de peso em animais machos e não foi efetivo em prover esse aumento em fêmeas, sugere-se que, devido à ação do estrógeno na redução do peso corporal, esse mesmo hormônio não possibilitou o ganho de peso observado em animais machos desmamados precocemente, por agir de forma antagônica nesse parâmetro. Vale salientar que, além dos efeitos sobre o consumo energético, o estrógeno também estimula a termogênese do tecido adiposo marrom mediante a sua ação no receptor ER α (MARTÍNEZ DE MORENTIN; GONZÁLEZ-GARCÍA; MARTINS; LAGE; FERNÁNDEZ-MALLO; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ; RUÍZ-PINO; LIU; MORGAN; PINILLA; GALLEGO; SAHA; KALSBECK; FLIERS; BISSCHOP; DIÉGUEZ; NOGUEIRAS; RAHMOUNI; TENA-SEMPERE; LÓPEZ, 2014).

O consumo de dieta padrão não foi diferente entre fêmeas controle e desmamadas. Porém, é observado em machos um aumento importante no consumo de dieta padrão, particularmente durante no ciclo escuro (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020). Assim, percebe-se, novamente, um comportamento oposto nas fêmeas e é, justamente, durante o período escuro do ciclo circadiano, que elas reduzem o tamanho da refeição quando estão no estro (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020), uma fase precedida por um pico

nos níveis de estrogênios circulantes. Fêmeas têm demonstrado um forte comportamento rítmico durante o ciclo ovariano (TARTTELIN; GORSKI, 1973). A redução alimentar durante o estro envolve alterações cíclicas na neurobiologia do controle do tamanho da refeição (TARTTELIN; GORSKI, 1973). Além disso, foi comprovado que ratas apresentam baixa eficiência calórica (WADE, 1975). No caso das ratas fêmeas tem se evidenciado uma interação entre leptina e estrogênios, onde ratas ovariectomizadas mostram níveis elevados de leptina, junto com um peso corporal elevado (CHU; CHOU; LIU; CHEN; SHYU; CHOU, 1999). A leptina é um hormônio anorexigênico. Entre os estrogênios, o E2 tem muitas evidências de seus efeitos sobre a alimentação com um efeito semelhante. (RIVERA; STINCIC, 2018). No controle homeostático do comportamento alimentar, o E2 tem um efeito anorexígeno tônico (DREWETT, 1973) e fásico (ECKEL, 2000). O primeiro se evidencia em ratas sem os ovários, a principal fonte de estrogênios em fêmeas, as quais subsequentemente mostram uma ingestão aumentada (DREWETT, 1973). A inibição fásica se evidencia nas flutuações da ingestão ao longo do ciclo estral. (ECKEL, 2000) . Com redução do consumo alimentar no estro, particularmente, há uma redução no tamanho da refeição. Essa ação anorexígena do estrógeno sobre o comportamento alimentar é atribuída à ação desse hormônio sobre receptores de estrógeno no hipotálamo e NTS (RIVERA; STINCIC, 2018). A injeção de E2 no núcleo arqueado do hipotálamo atua inibindo diretamente neurônios NPY/AgRP, que são orexigênicos. Isso resulta em reduções da ingestão alimentar e do peso corporal, bem como aumento na atividade física (AHDIEH; WADE, 1982). Essa ação é mediada pelo receptor $ER\alpha$, que age mediante sinalização nuclear (GRUBER; GRUBER; GRUBER; WIESER; HUBER, 2004) e, adicionalmente, por sinalização membranal em camundongos e cobaias (QIU; BOSCH; TOBIAS; KRUST; GRAHAM; MURPHY; KORACH; CHAMBON; SCANLAN; RØNNEKLEIV; KELLY, 2006). Portanto, a não alteração na ingestão alimentar de ratas desmamadas precocemente quando comparadas aos controles pode ser devido a uma ação do estrogênio. Além disso, as variações cíclicas observadas na ingestão de dieta padrão em ambos os grupos, podem estar associadas às variações do comportamento rítmico hormonal durante o ciclo ovariano. De fato, no presente estudo, não foi possível dosar os níveis desse hormônio para poder associá-lo categoricamente às alterações na ingestão. No entanto, estudos publicados que demonstram essa associação possibilitam essa sugestão.

Sabe-se que estrogênios reduzem o consumo alimentar, porém não é claro ainda qual é o efeito dos estrógenos na recompensa derivada do alimento, especificamente nas propriedades motivacionais do alimento. Foi observado, que em ratos machos desmamados precocemente há aumento do consumo de dieta palatável (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020). Eles apresentam níveis maiores de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos associados ao maior consumo de dieta palatável (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020). Neste estudo, não foram observadas alterações no consumo de fêmeas em relação aos tipos de dieta oferecidas, padrão ou palatável. Sabe-se que ratas são mais motivadas a trabalhar por cocaína durante a fase de estro comparado as outras fases do ciclo (CARROLL; MORGAN; LYNCH; CAMPBELL; DESS, 2002; ROBERTS; BENNETT; VICKERS, 1989). Ademais, a circuitaria encefálica da motivação alimentar é sobreposta àquela da adicção por drogas (VOLKOW; WANG; BALER, 2011), podendo levar à sugestão errônea de que, nessa fase, as fêmeas também poderiam estar mais motivadas por uma recompensa alimentar. Porém, é provável que os mecanismos de recompensa a drogas e ao alimento sejam diferenciados em fêmeas (RIVERA; STINCIC, 2018). Isso ocorreria porque o consumo de dieta palatável em fêmeas se deve mais ao valor calórico elevado do alimento do que ao fator palatável (GALEA, 2001). Estrógenos reduzem o consumo alimentar (ASARIAN; GEARY, 2013), e o uso de drogas de abuso aumentam os estrógenos (BECKER; HU, 2008). Foi observado que a recompensa alimentar varia ao longo do ciclo estral, com menor comportamento de motivação alimentar registrado na fase de estro (RICHARD; LÓPEZ-FERRERAS; ANDERBERG; OLANDERSSON; SKIBICKA, 2017). No mesmo experimento foi visto que a remoção dos ovários aumenta o comportamento motivado por comida. Também foi demonstrado que os estrogênios atuam diretamente em circuitos mesolímbicos de que reduzem a recompensa alimentar, uma vez que microinjeções específicas de estradiol na VTA reduziram o comportamento de recompensa alimentar (RICHARD; LÓPEZ-FERRERAS; ANDERBERG; OLANDERSSON; SKIBICKA, 2017). Foi observado que em ratas, o E2 reduz a motivação por sacarose (RICHARD; LÓPEZ-FERRERAS; ANDERBERG; OLANDERSSON; SKIBICKA, 2017) e não aumenta o efeito de recompensas alimentares (MARTINEZ; GROSS; HIMMLER; EMMITT; PETERSON; ZLEBNIK; FOSTER OLIVE; CARROLL; MEISEL; MERMELSTEIN,

2016). Isso é mediado por um mecanismo dependente de mGluR5 que aumenta a motivação pela cocaína mas não pela sacarose. (MARTINEZ; GROSS; HIMMLER; EMMITT; PETERSON; ZLEBNIK; FOSTER OLIVE; CARROLL; MEISEL; MERMELSTEIN, 2016) . Além disso, estudo comprova que as orexinas atuam de forma diferente em machos e fêmeas na busca da sacarose (CASON; ASTON-JONES, 2014). O desmame precoce não tem efeito sobre os níveis de estrógeno, exceto quando é induzido mediante bromocriptina (PIETROBON; BERTASSO; SILVA; PEIXOTO-SILVA; OLIVEIRA; MOURA; LISBOA, 2020). A partir disto, pode-se conjecturar que a presença do E2 confere um efeito protetor contra o estresse alimentar agudo sobre a ingestão de alimento palatável, evidenciado, no presente estudo, pela redução no consumo no dia 2 de estresse alimentar (estresse agudo).

Adicionalmente, o menor consumo de dieta palatável dos ratos DP no dia 2 poderia ser explicado por níveis mais altos de ansiedade. Até o presente momento, alguns estudos têm demonstrado aumento de comportamentos ansiosos em roedores submetidos a DP (KANARI; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2005; SHIMOZURU; KODAMA; IWASA; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2007). Assim, poderia se conjecturar que essa diferença de consumo poderia ser devido a uma manifestação de ansiedade frente um estímulo não familiar, o labirinto, no grupo dos ratos DP. Isso seria consistente com o que tem sido demonstrado no teste *Novelty Supressed Feeding*, o qual mensura a latência ao consumo dum alimento num ambiente, ou nesse caso, estímulo, não familiar (CAMPOS; FOGAÇA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2013). Avaliar o efeito dum agente ansiolítico nesse comportamento poderia ajudar a esclarecer essa possibilidade. No entanto, no presente estudo não foi evidenciada diferença nos resultados do labirinto em cruz elevado e também não houve diferença no consumo de dieta padrão como efeito do desmame precoce.

De fato, neste estudo, não houve diferenças no tempo de permanência nos braços abertos entre os dois grupos durante o teste do labirinto em cruz elevado. Esses resultados são consistentes com resultados de estudos anteriores feitos com ratos DP, em que os ratos machos permaneceram menos tempo no braço aberto e entraram menos nele, mas não houve diferença nem no tempo de permanência nem no número de entradas no caso das ratas fêmeas (ITO; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2006), sugerindo que o dimorfismo sexual é o responsável pelas diferenças entre os resultados do presente estudo, em fêmeas, e o que foi demonstrado em

estudos anteriores com machos. Em estudos com camundongos fêmeas ovariectomizadas, doses de E2 tiveram um efeito ansiolítico, aumentando a permanência em braços abertos durante a prova do labirinto em cruz elevado (KASTENBERGER; LUTSCH; SCHWARZER, 2012). Com base nisso, pode-se conjecturar que esses resultados são produto duma ação ansiolítica dos estrogênios, principalmente do E2. Essas ações do E2 variam de acordo com o receptor que ele ativa. Por exemplo, estudos em camundongos *knockout* têm observado que o receptor ER α regula efeitos ansiogênicos do hormônio, enquanto que *knockouts* e agonistas do ER β , como o diarilpropionitrilo e o WAY-200070, aumentam os sintomas ansiosos em provas como o labirinto em cruz elevado, tanto em ratos como em camundongos. Adicionalmente, o receptor de membrana GPR30 está envolvido na resposta ao estresse, já que demonstra maior imunorreatividade na amígdala basolateral em camundongos ovariectomizadas submetidas a estresse, com uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos da prova do labirinto (BORROW; HANDA, 2017). Portanto, considerando os efeitos protetores do estrogênio sobre os níveis de ansiedade, é possível que a ausência de diferenças no presente estudo, ou seja, a ausência de efeito ansiogênico do DP, seja um aspecto peculiar às fêmeas, uma vez que, em machos, tem sido demonstrado maior ansiedade em animais desmamados precocemente. Curiosamente, um maior tempo de permanência na área central do labirinto foi observado em ratas DP durante a prova basal. Este resultado poderia apontar para mudanças em variáveis comportamentais desconhecidas relacionadas ao DP. Até o momento, tem se correlacionado o tempo de permanência nessa área com uma maior impulsividade durante uma tarefa de condicionamento operante. (RICO; HURTADO-PARRADO; VÁSQUEZ-SEPÚLVEDA; FONSECA; CARDONA, 2017). Assim, fica em aberto para avaliações posteriores se o maior tempo de permanência na plataforma central observado no presente estudo, indica que essas fêmeas são mais impulsivas numa tarefa de condicionamento operante.

Quanto ao consumo de água, sabe-se que esse consumo nas ratas é prandial, sendo 70-85% das ingestões espontâneas relacionadas à alimentação (FITZSIMONS; LE MAGNEN, 1969). Este poderia ser o motivo do porquê não houve mudanças na ingestão de água, já que no presente experimento, o padrão de consumo de água observado nas ratas seguiu de perto o padrão de consumo alimentar delas. Mesmo assim, o E2 também está envolvido na regulação desse comportamento. Ele tem um efeito anti-dipsogênico, embora

esse efeito parece ser mediado por diferenças organizacionais dimórficas entre machos e fêmeas, uma vez que injeções do hormônio em ratos machos não tem o mesmo efeito. As estruturas que mediam esse efeito se aglomeram principalmente no hipotálamo. Elas incluem o Órgão Subfornical, o Hipotálamo Lateral, o Núcleo Paraventricular e o Núcleo Preóptico Mediano (SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997). Mesmo que o consumo de água em ratas seja prandial, o efeito anti-dipsogênico do E2 se dá ainda que não haja uma redução da ingestão alimentar. Injeções centrais do hormônio têm como resultado a diminuição da ingestão de água em ratos, especialmente injeções no hipotálamo lateral (SUZUKI; KOHNO; SAKURADA; TADANO; KISARA, 1982), enquanto que a sua administração subcutânea crônica aumenta a ingestão de água (CHOI; HARTZELL; AZAIN; BAILE, 2002). Portanto, a ausência de efeito do desmame precoce sobre a ingestão de água, observada no presente estudo, pode estar associada à ausência de efeito sobre o consumo alimentar. Como o consumo de água acompanha o consumo alimentar, não havendo alteração neste, também não haveria naquele. Contudo, o efeito inibidor sobre a ingestão líquida exercido pelo hormônio estrogênio não pode ser descartado completamente e estaria associado à variação cíclica da ingestão de água. Além disso, e de considerar a ação de outros hormônios sobre a ingestão de água, como no caso da grelina, que inibe a ingestão de água em condições dipsogênicas como serem a injeção central de AngII ou administração de solução salina hipertônica (MIETLICKI; NOWAK; DANIELS, 2009).

Portanto, este estudo demonstra o que aparenta ser um efeito protetor dos hormônios gonadais sobre o comportamento alimentar desregulado e sintomas de ansiedade em ratas fêmeas após serem submetidas ao Desmame Precoce e estresse alimentar. Mesmo que os resultados sejam consistentes com a literatura, parecem ser contraditórios com a maior incidência de transtornos alimentares e ansiosos nas mulheres. Os resultados deste estudo indicam a importância de se continuar estudando a interação entre o desmame precoce, dietas e estados hormonais. O uso de ovariectomia, antagonistas de receptores estrogênicos específicos em diversas idades e de ansiolíticos poderiam ajudar a desvendar a complexidade dessas interações e descobrir possíveis intervenções dietéticas e tratamentos farmacológicos para tratar os diversos transtornos que resultam do desequilíbrio entre essas variáveis. É claro que os estudos de comportamento alimentar feitos em ratas fêmeas são de vital importância para esse propósito.

8 CONCLUSÃO

O desmame precoce não resultou num aumento no consumo de alimento padrão ou palatável em ratas fêmeas submetidas a estresse alimentar agudo. Também não resultou numa diminuição no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Todos esses resultados são diferentes aos resultados obtidos em ratos machos. Assim, podemos conjecturar um possível papel do E2 como ansiolítico e anorexígeno em ratas fêmeas submetidas a desmame precoce.

REFERÊNCIAS

- AFIFI, Tracie O.; SAREEN, Jitender; FORTIER, Janique; TAILLIEU, Tamara; TURNER, Sarah; CHEUNG, Kristene; HENRIKSEN, Christine A. Child maltreatment and eating disorders among men and women in adulthood: Results from a nationally representative United States sample. **The International journal of eating disorders**, v. 50, n. 11, p. 1281–1296, 2017. doi:10.1002/eat.22783.
- AHDIEH, H. B.; WADE, G. N. Effects of hysterectomy on sexual receptivity, food intake, running wheel activity, and hypothalamic estrogen and progesterin receptors in rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 96, n. 6, p. 886–892, 1982.
- ARANA, F. Sergio; PARKINSON, John A.; HINTON, Elanor; HOLLAND, Anthony J.; OWEN, Adrian M.; ROBERTS, Angela C. Dissociable Contributions of the Human Amygdala and Orbitofrontal Cortex to Incentive Motivation and Goal Selection. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 29, p. 9632–9638, 2003. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-29-09632.2003.
- ASARIAN, Lori; GEARY, Nori. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. **Hormones and behavior**, v. 42, n. 4, p. 461–471, 2002. doi:10.1006/hbeh.2002.1835.
- AVENA, Nicole M.; LONG, Kristin A.; HOEBEL, Bartley G. Sugar-dependent rats show enhanced responding for sugar after abstinence: evidence of a sugar deprivation effect. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 3, p. 359–362, 2005. doi:10.1016/j.physbeh.2004.12.016.
- BADDAM, Suman K. R.; OLVERA, Rene L.; CANAPARI, Craig A.; CROWLEY, Michael J.; WILLIAMSON, Douglas E. Childhood Trauma and Stressful Life Events Are Independently Associated with Sleep Disturbances in Adolescents. **Behavioral sciences (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, 2019. doi:10.3390/bs9100108.
- BALDO, Brian A.; SADEGHIAN, Ken; BASSO, Ana Maria; KELLEY, Ann E. Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. **Behavioural brain research**, v. 137, 1-2, p. 165–177, 2002. doi:10.1016/S0166-4328(02)00293-0.
- BAQUERO, Arian F.; SOLIS, Alain J. de; LINDSLEY, Sarah R.; KIRIGITI, Melissa A.; SMITH, M. Susan; COWLEY, Michael A.; ZELTSER, Lori M.; GROVE, Kevin L. Developmental switch of leptin signaling in arcuate nucleus neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 30, p. 9982–9994, 2014. doi:10.1523/JNEUROSCI.0933-14.2014.
- BARSH, Gregory S.; SCHWARTZ, Michael W. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 8, p. 589–600, 2002. doi:10.1038/nrg862.

- BASSAREO, Valentina; DI CHIARA, Gaetano. Differential Influence of Associative and Nonassociative Learning Mechanisms on the Responsiveness of Prefrontal and Accumbal Dopamine Transmission to Food Stimuli in Rats Fed Ad Libitum. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 851–861, 1997. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-02-00851.1997.
- BEAUCHAMP, G. K.; COWART, B. J.; MORAN, M. Developmental changes in salt acceptability in human infants. **Developmental psychobiology**, v. 19, n. 1, p. 17–25, 1986. doi:10.1002/dev.420190103.
- BECKER, Jill B.; HU, Ming. Sex differences in drug abuse. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 36–47, 2008. doi:10.1016/j.yfrne.2007.07.003.
- BORROW, A. P.; HANDA, R. J. Estrogen Receptors Modulation of Anxiety-Like Behavior. **Vitamins and hormones**, v. 103, p. 27–52, 2017. doi:10.1016/bs.vh.2016.08.004.
- BOWATTE, G.; THAM, R.; ALLEN, K. J.; TAN, D. J.; LAU, Mxz; DAI, X.; LODGE, C. J. Breastfeeding and childhood acute otitis media: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 104, n. 467, p. 85–95, 2015. doi:10.1111/apa.13151.
- BROADWELL, R. D.; BRIGHTMAN, M. W. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. **The Journal of comparative neurology**, v. 166, n. 3, p. 257–283, 1976. doi:10.1002/cne.901660302.
- CAMPOS, Alline C.; FOGAÇA, Manoela V.; AGUIAR, Daniele C.; GUIMARÃES, Francisco S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, 35 Suppl 2, S101-11, 2013. doi:10.1590/1516-4446-2013-1139.
- CARROLL, Marilyn E.; MORGAN, Andrew D.; LYNCH, Wendy J.; CAMPBELL, Una C.; DESS, Nancy K. Intravenous cocaine and heroin self-administration in rats selectively bred for differential saccharin intake: phenotype and sex differences. **Psychopharmacology**, v. 161, n. 3, p. 304–313, 2002. doi:10.1007/s00213-002-1030-5.
- CASON, Angie M.; ASTON-JONES, Gary. Role of orexin/hypocretin in conditioned sucrose-seeking in female rats. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 97–102, 2014. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.07.007.
- CHOI, Yang-Ho; HARTZELL, Diane; AZAIN, Michael J.; BAILE, Clifton A. TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. **Physiology & behavior**, v. 77, n. 1, p. 1–4, 2002. doi:10.1016/S0031-9384(02)00784-9.
- CHU, Shu-Chen; CHOU, You-Chung; LIU, Jer-Yuh; CHEN, Chin-Hsun; SHYU, Jyh-Cherng; CHOU, Fen-Pi. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and

the influence of estrogen supplement. **Life Sciences**, v. 64, n. 24, p. 2299–2306, 1999. doi:10.1016/s0024-3205(99)00181-2.

CICCOCIOPPO, Roberto; FEDELI, Amalia; ECONOMIDOU, Daina; POLICANI, Federica; WEISS, Friedbert; MASSI, Maurizio. The Bed Nucleus Is a Neuroanatomical Substrate for the Anorectic Effect of Corticotropin-Releasing Factor and for Its Reversal by Nociceptin/Orphanin FQ. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 28, p. 9445–9451, 2003. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-28-09445.2003.

CRAMER, C. P.; THIELS, E.; ALBERTS, J. R. Weaning in rats: I. Maternal behavior. **Developmental psychobiology**, v. 23, n. 6, p. 479–493, 1990. doi:10.1002/dev.420230604.

DA SILVA, M. C.; SOUZA, J. A. de; DOS SANTOS, L. O.; PINHEIRO, I. L.; BORBA, T. K. F.; DA SILVA, A. A. M.; CASTRO, R. M. de; SOUZA, S. L. de. 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. 3, p. 219–228, 2014. doi:10.1017/S204017441400018X.

DATE, Yukari; MURAKAMI, Noboru; TOSHINAI, Koji; MATSUKURA, Shigeru; NIIJIMA, Akira; MATSUO, Hisayuki; KANGAWA, Kenji; NAKAZATO, Masamitsu. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1120–1128, 2002. doi:10.1053/gast.2002.35954.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 473, p. 367–381, 1986. doi:10.1111/j.1749-6632.1986.tb23629.x.

Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5. ed. Washington D.C.: American Psychiatric Association, 2013. xlv, 947 ;. ISBN 978-0-89042-555-8.

DOMINGO-RODRIGUEZ, Laura; RUIZ DE AZUA, Inigo; DOMINGUEZ, Eduardo; SENABRE, Eric; SERRA, Irene; KUMMER, Sami; NAVANDAR, Mohit; BADDENHAUSEN, Sarah; HOFMANN, Clementine; ANDERO, Raul; GERBER, Susanne; NAVARRETE, Marta; DIERSSEN, Mara; LUTZ, Beat; MARTÍN-GARCÍA, Elena; MALDONADO, Rafael. A specific prelimbic-nucleus accumbens pathway controls resilience versus vulnerability to food addiction. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 782, 2020. doi:10.1038/s41467-020-14458-y.

DOS SANTOS OLIVEIRA, Lisiane; LIMA, Deise Pereira de; DA SILVA, Amanda Alves Marcelino; DA SILVA, Matilde Cesiana; SOUZA, Sandra Lopes de; MANHÃES-DE-CASTRO, Raul. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. **Behavioural processes**, v. 86, n. 1, p. 75–80, 2011. doi:10.1016/j.beproc.2010.09.005.

DOUGLASS, Amelia M.; KUCUKDERELI, Hakan; PONSERRE, Marion; MARKOVIC, Milica; GRÜNDEMANN, Jan; STROBEL, Cornelia; ALCALA MORALES, Pilar L.; CONZELMANN, Karl-Klaus; LÜTHI, Andreas; KLEIN, Rüdiger. Central amygdala

circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism. **Nature neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 1384–1394, 2017. doi:10.1038/nn.4623.

DREWETT, R. F. Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 4, p. 772–780, 1973. doi:10.1016/S0003-3472(73)80103-4.

ECKEL, L. A.; LANGHANS, W.; KAHLER, A.; CAMPFIELD, L. A.; SMITH, F. J.; GEARY, N. Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in female rats. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 1, R186-93, 1998. doi:10.1152/ajpregu.1998.275.1.R186.

ECKEL, L. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. **Physiology & behavior**, v. 70, 3-4, p. 397–405, 2000. doi:10.1016/S0031-9384(00)00278-X.

ELIAS, C. F.; SAPER, C. B.; MARATOS-FLIER, E.; TRITOS, N. A.; LEE, C.; KELLY, J.; TATRO, J. B.; HOFFMAN, G. E.; OLLMANN, M. M.; BARSH, G. S.; SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J. K. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **The Journal of comparative neurology**, v. 402, n. 4, p. 442–459, 1998.

FANSELOW, Michael S.; KIM, Jeansok J.; YIPP, Jon; OCA, Beatrice de. Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. **Behavioral neuroscience**, v. 108, n. 2, p. 235–240, 1994. doi:10.1037//0735-7044.108.2.235.

FAROOQI, I. Sadaf; BULLMORE, Edward; KEOGH, Julia; GILLARD, Jonathan; O'RAHILLY, Stephen; FLETCHER, Paul C. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5843, p. 1355, 2007. doi:10.1126/science.1144599.

FILGUEIRAS, Julio Cesar; HIPPERT, Maria Isabel Steinherz. A polêmica em torno do conceito de estresse. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 19, n. 3, p. 40–51, 1999. doi:10.1590/s1414-98931999000300005.

FITZSIMONS, T. J.; LE MAGNEN, J. Eating as a regulatory control of drinking in the rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 67, n. 3, p. 273–283, 1969. doi:10.1037/h0026772.

FORESTELL, Catherine A.; MENNELLA, Julie A. Early determinants of fruit and vegetable acceptance. **Pediatrics**, v. 120, n. 6, p. 1247–1254, 2007. doi:10.1542/peds.2007-0858.

FRANCKE, Paul; TIEDEMANN, Lena J.; MENZ, Mareike M.; BECK, Judith; BÜCHEL, Christian; BRASSEN, Stefanie. Mesolimbic white matter connectivity mediates the preference for sweet food. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4349, 2019. doi:10.1038/s41598-019-40935-6.

FUKUSHIMA, Atsushi; HAGIWARA, Hiroko; FUJIOKA, Hitomi; KIMURA, Fukuko; AKEMA, Tatsuo; FUNABASHI, Toshiya. Sex differences in feeding behavior in rats:

the relationship with neuronal activation in the hypothalamus. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 88, 2015. doi:10.3389/fnins.2015.00088.

GALEA, L. High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning, stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory. **Behavioural brain research**, v. 126, 1-2, p. 115–126, 2001. doi:10.1016/s0166-4328(01)00255-8.

GAO, He-Ren; ZHUANG, Qian-Xing; LI, Bin; LI, Hong-Zhao; CHEN, Zhang-Peng; WANG, Jian-Jun; ZHU, Jing-Ning. Corticotropin releasing factor excites neurons of posterior hypothalamic nucleus to produce tachycardia in rats. **Scientific reports**, v. 6, p. 20206, 2016. doi:10.1038/srep20206.

GARCÍA-GARCÍA, Isabel; KUBE, Jana; MORYS, Filip; SCHRIMPF, Anne; KANAAN, Ahmad S.; GAEBLER, Michael; VILLRINGER, Arno; DAGHER, Alain; HORSTMANN, Annette; NEUMANN, Jane. Liking and left amygdala activity during food versus nonfood processing are modulated by emotional context. **Cognitive, affective & behavioral neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 91–102, 2020. doi:10.3758/s13415-019-00754-8.

GHIZONI, Heloisa; FIGUEIREDO, Priscila Moreira; MOISAN, Marie-Pierre; OGIAS, Daniela; OSAKI, Luciana Harumi; GAMA, Patrícia. Regulation of corticosterone function during early weaning and effects on gastric cell proliferation. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 30, n. 3, p. 343–349, 2014. doi:10.1016/j.nut.2013.09.003.

GIUGLIANI, Elsa R. J.; HORTA, Bernardo L.; LORET DE MOLA, Christian; LISBOA, Bernardo O.; VICTORA, Cesar G. Effect of breastfeeding promotion interventions on child growth: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 104, n. 467, p. 20–29, 2015. doi:10.1111/apa.13160.

GODFREY, Nathan; BORGLAND, Stephanie L. Diversity in the lateral hypothalamic input to the ventral tegmental area. **Neuropharmacology**, v. 154, p. 4–12, 2019. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.05.014.

GROVER, Rachel L.; GINSBURG, Golda S.; IALONGO, Nick. Psychosocial outcomes of anxious first graders: a seven-year follow-up. **Depression and anxiety**, v. 24, n. 6, p. 410–420, 2007. doi:10.1002/da.20241.

GRUBER, Christian J.; GRUBER, Doris M.; GRUBER, Isabel M. L.; WIESER, Fritz; HUBER, Johannes C. Anatomy of the estrogen response element. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 15, n. 2, p. 73–78, 2004. doi:10.1016/j.tem.2004.01.008.

GUTIERREZ, Ranier; LOBO, Mary Kay; ZHANG, Feng; LECEA, Luis de. Neural integration of reward, arousal, and feeding: recruitment of VTA, lateral hypothalamus, and ventral striatal neurons. **IUBMB life**, v. 63, n. 10, p. 824–830, 2011. doi:10.1002/iub.539.

HANCOCK, Stephanie; GRANT, Virginia. Early maternal separation increases symptoms of activity-based anorexia in male and female rats. **Journal of**

experimental psychology. Animal behavior processes, v. 35, n. 3, p. 394–406, 2009. doi:10.1037/a0014736.

HEINIG, M. J.; NOMMSEN, L. A.; PEERSON, J. M.; LONNERDAL, B.; DEWEY, K. G. Intake and growth of breast-fed and formula-fed infants in relation to the timing of introduction of complementary foods: the DARLING study. Davis Area Research on Lactation, Infant Nutrition and Growth. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 82, n. 12, p. 999–1006, 1993. doi:10.1111/j.1651-2227.1993.tb12798.x.

HRYHORCZUK, Cecile; SHENG, Zhenyu; DÉCARIE-SPAIN, Léa; GIGUÈRE, Nicolas; DUCROT, Charles; TRUDEAU, Louis-Éric; ROUTH, Vanessa H.; ALQUIER, Thierry; FULTON, Stephanie. Oleic Acid in the Ventral Tegmental Area Inhibits Feeding, Food Reward, and Dopamine Tone. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 3, p. 607–616, 2018. doi:10.1038/npp.2017.203.

HUMPHREY, Louise T. Weaning behaviour in human evolution. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 4, p. 453–461, 2010. doi:10.1016/j.semcd.2009.11.003.

HUOT, Rebecca L.; PLOTSKY, Paul M.; LENOX, Robert H.; MCNAMARA, Robert K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research**, v. 950, 1-2, p. 52–63, 2002. doi:10.1016/S0006-8993(02)02985-2.

ISHIKAWA, Junko; NISHIMURA, Ryoichi; ISHIKAWA, Akinori. Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. **The European journal of neuroscience**, v. 41, n. 4, p. 442–453, 2015. doi:10.1111/ejn.12825.

ITO, Akie; KIKUSUI, Takefumi; TAKEUCHI, Yukari; MORI, Yuji. Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. **Behavioural brain research**, v. 171, n. 1, p. 87–93, 2006. doi:10.1016/j.bbr.2006.03.023.

JONES, Edward S.; NUNN, Nicolas; CHAMBERS, Adam P.; ØSTERGAARD, Søren; WULFF, Birgitte S.; LUCKMAN, Simon M. Modified Peptide YY Molecule Attenuates the Activity of NPY/AgRP Neurons and Reduces Food Intake in Male Mice. **Endocrinology**, v. 160, n. 11, p. 2737–2747, 2019. doi:10.1210/en.2019-00100.

KANARI, Kahoru; KIKUSUI, Takefumi; TAKEUCHI, Yukari; MORI, Yuji. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural brain research**, v. 156, n. 1, p. 45–52, 2005. doi:10.1016/j.bbr.2004.05.008.

KASTENBERGER, Iris; LUTSCH, Christian; SCHWARZER, Christoph. Activation of the G-protein-coupled receptor GPR30 induces anxiogenic effects in mice, similar to oestradiol. **Psychopharmacology**, v. 221, n. 3, p. 527–535, 2012. doi:10.1007/s00213-011-2599-3.

- KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. **Journal of neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 427–431, 2009. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01837.x.
- KIKUSUI, Takefumi; ICHIKAWA, Sozo; MORI, Yuji. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 5, p. 762–772, 2009. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.12.009.
- KIKUSUI, Takefumi; KIYOKAWA, Yasushi; MORI, Yuji. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain Research**, v. 1133, n. 1, p. 115–122, 2007. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.031.
- KIKUSUI, Takefumi; NAKAMURA, Kayo; KAKUMA, Yoshie; MORI, Yuji. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. **Behavioural brain research**, v. 175, n. 1, p. 96–103, 2006. doi:10.1016/j.bbr.2006.08.007.
- KITCHEN, I.; LESLIE, F. M.; KELLY, M.; BARNES, R.; CROOK, T. J.; HILL, R. G.; BORSODI, A.; TOTH, G.; MELCHIORRI, P.; NEGRI, L. Development of delta-opioid receptor subtypes and the regulatory role of weaning: radioligand binding, autoradiography and in situ hybridization studies. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 275, n. 3, p. 1597–1607, 1995.
- KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; NAKAZATO, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656–660, 1999. doi:10.1038/45230.
- LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, 275-88; discussion 289-93, 1994. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb39245.x.
- LI, L. A.; YANG, J. J.; LI, Y.; LV, L.; XIE, J. J.; DU, G. M.; JIN, T. M.; QIN, S. Y.; JIAO, X. L. Effect of weaning age on cortisol release in piglets. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 15, n. 2, 2016. doi:10.4238/gmr.15027693.
- LIMA, Natália da Silva; MOURA, Egberto Gaspar de; PASSOS, Magna Cottini Fonseca; NOGUEIRA NETO, Firmino José; REIS, Adelina Martha; OLIVEIRA, Elaine de; LISBOA, Patricia Cristina. 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, 2011. doi:10.1017/S0007114510005064.
- LIORET, Sandrine; BETOKO, Aisha; FORHAN, Anne; CHARLES, Marie-Aline; HEUDE, Barbara; LAUZON-GUILLAIN, Blandine de. Dietary patterns track from infancy to preschool age: cross-sectional and longitudinal perspectives. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 4, p. 775–782, 2015. doi:10.3945/jn.114.201988.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–340, 1990. doi:10.1016/0163-7258(90)90021-s.

- LIU, Clarissa M.; KANOSKI, Scott E. Homeostatic and non-homeostatic controls of feeding behavior: Distinct vs. common neural systems. **Physiology & behavior**, v. 193, Pt B, p. 223–231, 2018. doi:10.1016/j.physbeh.2018.02.011.
- LIU, Xiaoning; GAO, Shengli; ZHANG, Nana; JIN, Tingting; SUN, Xiangrong; LUAN, Xiao; XU, Luo; GUO, Feifei. The orexinergic neural pathway from the lateral hypothalamus to the nucleus accumbens and its regulation of palatable food intake. **Neuropeptides**, v. 80, p. 102028, 2020. doi:10.1016/j.npep.2020.102028.
- LOCKIE, Sarah H.; STARK, Romana; SPANSWICK, David C.; ANDREWS, Zane B. Glucose availability regulates ghrelin-induced food intake in the ventral tegmental area. **Journal of neuroendocrinology**, v. 31, n. 7, e12696, 2019. doi:10.1111/jne.12696.
- LUPIEN, Sonia J.; MCEWEN, Bruce S.; GUNNAR, Megan R.; HEIM, Christine. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 434–445, 2009. doi:10.1038/nrn2639.
- LUPIEN, Sonia J.; PARENT, Sophie; EVANS, Alan C.; TREMBLAY, Richard E.; ZELAZO, Philip David; CORBO, Vincent; PRUESSNER, Jens C.; SÉGUIN, Jean R. Larger amygdala but no change in hippocampal volume in 10-year-old children exposed to maternal depressive symptomatology since birth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 34, p. 14324–14329, 2011. doi:10.1073/pnas.1105371108.
- MACHADO, Ângelo B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 363 p. (Biblioteca biomedica). ISBN 85-7379-069-5.
- MAIER, Andrea S.; CHABANET, Claire; SCHAAL, Benoist; LEATHWOOD, Peter D.; ISSANCHOU, Sylvie N. Breastfeeding and experience with variety early in weaning increase infants' acceptance of new foods for up to two months. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 27, n. 6, p. 849–857, 2008. doi:10.1016/j.clnu.2008.08.002.
- MAIER-NÖTH, Andrea; SCHAAL, Benoist; LEATHWOOD, Peter; ISSANCHOU, Sylvie. The Lasting Influences of Early Food-Related Variety Experience: A Longitudinal Study of Vegetable Acceptance from 5 Months to 6 Years in Two Populations. **PLoS one**, v. 11, n. 3, e0151356, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0151356.
- MANIAM, Jayanthi; MORRIS, Margaret J. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 5, p. 717–728, 2010. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.10.013.
- MAREN, S.; FANSELOW, M. S. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7548–7564, 1995. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-11-07548.1995.
- MARINO, Rosa Anna M.; MCDEVITT, Ross A.; GANTZ, Stephanie C.; SHEN, Hui; PIGNATELLI, Marco; XIN, Wendy; WISE, Roy A.; BONCI, Antonello. Control of food

approach and eating by a GABAergic projection from lateral hypothalamus to dorsal pons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 15, p. 8611–8615, 2020. doi:10.1073/pnas.1909340117.

MARTÍNEZ DE MORENTIN, Pablo B.; GONZÁLEZ-GARCÍA, Ismael; MARTINS, Luís; LAGE, Ricardo; FERNÁNDEZ-MALLO, Diana; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, Noelia; RUÍZ-PINO, Francisco; LIU, Ji; MORGAN, Donald A.; PINILLA, Leonor; GALLEGO, Rosalía; SAHA, Asish K.; KALSBECK, Andries; FLIERS, Eric; BISSCHOP, Peter H.; DIÉGUEZ, Carlos; NOGUEIRAS, Rubén; RAHMOUNI, Kamal; TENA-SEMPERE, Manuel; LÓPEZ, Miguel. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. **Cell metabolism**, v. 20, n. 1, p. 41–53, 2014. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.031.

MARTINEZ, Luis A.; GROSS, Kellie S.; HIMMLER, Brett T.; EMMITT, Nicole L.; PETERSON, Brittni M.; ZLEBNIK, Natalie E.; FOSTER OLIVE, M.; CARROLL, Marilyn E.; MEISEL, Robert L.; MERMELSTEIN, Paul G. Estradiol Facilitation of Cocaine Self-Administration in Female Rats Requires Activation of mGluR5. **eNeuro**, v. 3, n. 5, 2016. doi:10.1523/ENEURO.0140-16.2016.

MENNELLA, J. A. Flavour programming during breast-feeding. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 639, p. 113–120, 2009. doi:10.1007/978-1-4020-8749-3_9.

MICHAELS, Clifford C.; HOLTZMAN, Stephen G. Enhanced sensitivity to naltrexone-induced drinking suppression of fluid intake and sucrose consumption in maternally separated rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 86, n. 4, p. 784–796, 2007. doi:10.1016/j.pbb.2007.03.007.

MIETLICKI, Elizabeth G.; NOWAK, Erica L.; DANIELS, Derek. The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 1, p. 37–43, 2009. doi:10.1016/j.physbeh.2008.08.004.

MIHRSHAHI, Seema; BATTISTUTTA, Diana; MAGAREY, Anthea; DANIELS, Lynne A. Determinants of rapid weight gain during infancy: baseline results from the NOURISH randomised controlled trial. **BMC pediatrics**, v. 11, p. 99, 2011. doi:10.1186/1471-2431-11-99.

MURTHY, Sahana; GOULD, Elizabeth. Early Life Stress in Rodents: Animal Models of Illness or Resilience? **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 157, 2018. doi:10.3389/fnbeh.2018.00157.

OLIVA, Idaira; DONATE, Melissa M.; LEFNER, Merridee J.; WANAT, Matthew J. Cocaine experience abolishes the motivation suppressing effect of CRF in the ventral midbrain. **Addiction biology**, e12837, 2019. doi:10.1111/adb.12837.

OLIVEIRA, Lisiane dos Santos; DA SILVA, Ligia Pereira; DA SILVA, Aline Isabel; MAGALHÃES, Carolina Peixoto; SOUZA, Sandra Lopes de; CASTRO, Raul Manhães de. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural processes**, v. 86, n. 1, p. 119–124, 2011. doi:10.1016/j.beproc.2010.10.001.

ONO, M.; KIKUSUI, T.; SASAKI, N.; ICHIKAWA, M.; MORI, Y.; MURAKAMI-MUROFUSHI, K. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 1103–1110, 2008. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.07.078.

PALMITER, Richard D. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 8, p. 375–381, 2007. doi:10.1016/j.tins.2007.06.004.

PETROVICH, Gorica D.; GALLAGHER, Michela. Amygdala subsystems and control of feeding behavior by learned cues. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 985, p. 251–262, 2003. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07086.x.

Pietrobon, Carla Bruna; Bertasso, Iala Milene; Silva, Beatrix S.; Peixoto-Silva, Nayara; Oliveira, Elaine; Moura, Egberto Gaspar; Lisboa, Patricia Cristina. Body Adiposity and Endocrine Profile of Female Wistar Rats of Distinct Ages that were Early Weaned. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme**, v. 52, n. 1, p. 58–66, 2020. doi:10.1055/a-0966-8784.

PIETROBON, Carla Bruna; MIRANDA, Rosiane Aparecida; BERTASSO, Iala Milene; MATHIAS, Paulo Cezar de Freitas; BONFLEUR, Maria Lúcia; BALBO, Sandra Lucinei; REIS, Marise Auxiliadora de Barros; LATORRACA, Márcia Queiroz; ARANTES, Vanessa Cristina; OLIVEIRA, Elaine de; LISBOA, Patrícia Cristina; MOURA, Egberto Gaspar de. Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in Wistar rats of both sexes. **The Journal of physiology**, v. 598, n. 3, p. 489–502, 2020. doi:10.1113/JP278833.

POMRENZE, Matthew B.; TOVAR-DIAZ, Jorge; BLASIO, Angelo; MAIYA, Rajani; GIOVANETTI, Simone M.; LEI, Kelly; MORIKAWA, Hitoshi; HOPF, F. Woodward; MESSING, Robert O. A Corticotropin Releasing Factor Network in the Extended Amygdala for Anxiety. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 6, p. 1030–1043, 2019. doi:10.1523/JNEUROSCI.2143-18.2018.

PURSEY, Kirrilly M.; CONTRERAS-RODRIGUEZ, Oren; COLLINS, Clare E.; STANWELL, Peter; BURROWS, Tracy L. Food Addiction Symptoms and Amygdala Response in Fasted and Fed States. **Nutrients**, v. 11, n. 6, 2019. doi:10.3390/nu11061285.

QIU, Jian; BOSCH, Martha A.; TOBIAS, Sandra C.; KRUST, Andree; GRAHAM, Sharon M.; MURPHY, Stephanie J.; KORACH, Kenneth S.; CHAMBON, Pierre; SCANLAN, Thomas S.; RØNNEKLEIV, Oline K.; KELLY, Martin J. A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 21, p. 5649–5655, 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.0327-06.2006.

Report of the Task Force on the Assessment of the Scientific Evidence Relating to Infant-Feeding Practices and Infant Health. **Pediatrics**, v. 74, 4 Pt 2, p. 579–762, 1984.

RICHARD, Jennifer E.; LÓPEZ-FERRERAS, Lorena; ANDERBERG, Rozita H.; OLANDERSSON, Kajsa; SKIBICKA, Karolina P. Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 78, p. 193–202, 2017. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.01.014.

RICO, Javier Leonardo; HURTADO-PARRADO, Camilo; VÁSQUEZ-SEPÚLVEDA, Juan; FONSECA, Juan; CARDONA, Ángelo. El tiempo en el área central del laberinto en cruz elevado correlaciona con medidas relacionadas a impulsividad durante una tarea operante. **Universitas Psychologica**, v. 15, n. 5, 2017. doi:10.11144/Javeriana.upsy15-5.tcae.

RIVERA, H. M.; STINCIC, T. L. Estradiol and the control of feeding behavior. **Steroids**, v. 133, p. 44–52, 2018. doi:10.1016/j.steroids.2017.11.011.

ROBERTS, D. C.; BENNETT, S. A.; VICKERS, G. J. The estrous cycle affects cocaine self-administration on a progressive ratio schedule in rats. **Psychopharmacology**, v. 98, n. 3, p. 408–411, 1989. doi:10.1007/BF00451696.

ROBINSON, Siobhan; RAINWATER, Aundrea J.; HNASKO, Thomas S.; PALMITER, Richard D. Viral restoration of dopamine signaling to the dorsal striatum restores instrumental conditioning to dopamine-deficient mice. **Psychopharmacology**, v. 191, n. 3, p. 567–578, 2007. doi:10.1007/s00213-006-0579-9.

ROM, Oren; REZNICK, Abraham Z. The Stress Reaction: A Historical Perspective. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 905, p. 1–4, 2016. doi:10.1007/5584_2015_195.

RYU, Vitaly; YOO, Sang Bae; KANG, Dong-Won; LEE, Jong-Ho; JAHNG, Jeong Won. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. **Brain Research**, v. 1295, p. 127–134, 2009. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.006.

SAHUQUE, Lacey L.; KULLBERG, Erika F.; MCGEEHAN, Andrew J.; KINDER, Jennifer R.; HICKS, Megan P.; BLANTON, Mary G.; JANAK, Patricia H.; OLIVE, M. Foster. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 1, p. 122–132, 2006. doi:10.1007/s00213-006-0362-y.

SALEH, A.; POTTER, G. G.; MCQUOID, D. R.; BOYD, B.; TURNER, R.; MACFALL, J. R.; TAYLOR, W. D. Effects of early life stress on depression, cognitive performance and brain morphology. **Psychological medicine**, v. 47, n. 1, p. 171–181, 2017. doi:10.1017/S0033291716002403.

SANKAR, Mari Jeeva; SINHA, Bireswar; CHOWDHURY, Ranadip; BHANDARI, Nita; TANEJA, Sunita; MARTINES, Jose; BAHL, Rajiv. Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 104, n. 467, p. 3–13, 2015. doi:10.1111/apa.13147.

- SAPER, C. B. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. **Annual review of neuroscience**, v. 25, 2002. doi:10.1146/annurev.neuro.25.032502.111311.
- SAPER, Clifford B.; CHOU, Thomas C.; ELMQUIST, Joel K. The Need to Feed. **Neuron**, v. 36, n. 2, p. 199–211, 2002. doi:10.1016/s0896-6273(02)00969-8.
- SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; CAMPFIELD, L. A.; BURN, P.; BASKIN, D. G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 5, p. 1101–1106, 1996. doi:10.1172/JCI118891.
- SEELEY, Randy J.; BLAKE, Kathleen; RUSHING, Paul A.; BENOIT, Stephen; ENG, John; WOODS, Stephen C.; D'ALESSIO, David. The Role of CNS Glucagon-Like Peptide-1 (7-36) Amide Receptors in Mediating the Visceral Illness Effects of Lithium Chloride. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1616–1621, 2000. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-04-01616.2000.
- SELYE, Hans. Stress without Distress. In: SERBAN, G. (Org.). **Psychopathology of Human Adaptation**, Boston, MA: Springer US, 1976. ISBN 978-1-4684-2240-5, p. 137–146.
- SENN, Verena; WOLFF, Steffen B. E.; HERRY, Cyril; GRENIER, François; EHRLICH, Ingrid; GRÜNDEMANN, Jan; FADOK, Jonathan P.; MÜLLER, Christian; LETZKUS, Johannes J.; LÜTHI, Andreas. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 428–437, 2014. doi:10.1016/j.neuron.2013.11.006.
- SERVONNET, Alice; HERNANDEZ, Giovanni; EL HAGE, Cynthia; ROMPRÉ, Pierre-Paul; SAMAHA, Anne-Noël. Optogenetic Activation of the Basolateral Amygdala Promotes Both Appetitive Conditioning and the Instrumental Pursuit of Reward Cues. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 8, p. 1732–1743, 2020. doi:10.1523/JNEUROSCI.2196-19.2020.
- SHIMOZURU, Michito; KODAMA, Yuka; IWASA, Takashi; KIKUSUI, Takefumi; TAKEUCHI, Yukari; MORI, Yuji. Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of Wistar rats. **Developmental psychobiology**, v. 49, n. 4, p. 343–350, 2007. doi:10.1002/dev.20202.
- SHUGHRUE, Paul J.; LANE, Malcolm V.; MERCHENTHALER, Istvan. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. **The Journal of comparative neurology**, v. 388, n. 4, p. 507–525, 1997. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19971201)388:4<507::aid-cne1>3.0.co;2-6.
- SMALL, D. M.; ZATORRE, R. J.; DAGHER, A.; EVANS, A. C.; JONES-GOTMAN, M. Changes in brain activity related to eating chocolate: from pleasure to aversion. **Brain : a journal of neurology**, v. 124, Pt 9, p. 1720–1733, 2001. doi:10.1093/brain/124.9.1720.
- SMITH, Ashley E.; KASPER, James M.; ANASTASIO, Noelle C.; HOMMEL, Jonathan D. Binge-Type Eating in Rats is Facilitated by Neuromedin U Receptor 2 in

the Nucleus Accumbens and Ventral Tegmental Area. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 2019. doi:10.3390/nu11020327.

SOLDATELI, Betina; VIGO, Alvaro; GIUGLIANI, Elsa Regina Justo. Effect of Pattern and Duration of Breastfeeding on the Consumption of Fruits and Vegetables among Preschool Children. **PloS one**, v. 11, n. 2, e0148357, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0148357.

SOUZA, Julliet Araújo de; DA SILVA, Matilde Cesiana; COSTA, Fernanda Cicalese Ourem; MATOS, Rhowena Jane Barbosa de; FARIAS CAMPINA, Renata Cristinny de; DO AMARAL ALMEIDA, Larissa Cavalcanti; DA SILVA, Amanda Alves Marcelino; CAVALCANTE, Taisy Cinthia Ferro; TAVARES, Gabriel Araújo; SOUZA, Sandra Lopes de. Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 192, p. 172908, 2020. doi:10.1016/j.pbb.2020.172908.

SOUZA, Julliet Araújo de; DA SILVA, Matilde Cesiana; MATOS, Rhowena Jane Barbosa de; DO AMARAL ALMEIDA, Larissa Cavalcanti; BELTRÃO, Luana Cruz; SOUZA, Felipe Leitão de; CASTRO, Raul Manhães de; SOUZA, Sandra Lopes de. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. **Appetite**, v. 123, p. 114–119, 2018. doi:10.1016/j.appet.2017.12.004.

STEGER, R. W.; PELUSO, J. J. Effects of age on hormone levels and in vitro steroidogenesis by rat ovary and adrenal. **Experimental aging research**, v. 8, 3-4, p. 203–208, 1982. doi:10.1080/03610738208260367.

STEINER, Jacob E. Human Facial Expressions in Response to Taste and Smell Stimulation. **Advances in Child Development and Behavior Volume 13**: Elsevier, 1979 (Advances in Child Development and Behavior. ISBN 9780120097135, p. 257–295.

STROBEL, Cornelia; MAREK, Roger; GOOCH, Helen M.; SULLIVAN, Robert K. P.; SAH, Pankaj. Prefrontal and Auditory Input to Intercalated Neurons of the Amygdala. **Cell reports**, v. 10, n. 9, p. 1435–1442, 2015. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.008.

SU, Xiujuan; LIANG, Hong; YUAN, Wei; OLSEN, Jørn; CNATTINGIUS, Sven; LI, Jiong. Prenatal and early life stress and risk of eating disorders in adolescent girls and young women. **European child & adolescent psychiatry**, v. 25, n. 11, p. 1245–1253, 2016. doi:10.1007/s00787-016-0848-z.

SUZUKI, Tomoharu; KOHNO, Hiroyuki; SAKURADA, Tsukasa; TADANO, Takeshi; KISARA, Kensuke. Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 17, n. 2, p. 249–253, 1982. doi:10.1016/0091-3057(82)90078-8.

TAKITA, Masatoshi; KIKUSUI, Takefumi. Early weaning augments the spontaneous release of dopamine in the amygdala but not the prefrontal cortex: an in vivo

microdialysis study of male rats. **Experimental animals**, v. 69, n. 4, p. 382–387, 2020. doi:10.1538/expanim.20-0015.

TAKITA, Masatoshi; KIKUSUI, Takefumi. Early weaning influences short-term synaptic plasticity in the medial prefrontal-anterior basolateral amygdala pathway. **Neuroscience research**, v. 103, p. 48–53, 2016. doi:10.1016/j.neures.2015.08.003.

TARTTELIN, M. F. Cyclical variations in food and water intakes in ewes. **The Journal of physiology**, v. 195, n. 2, 29P-31P, 1968.

TARTTELIN, M. F.; GORSKI, R. A. The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. **Acta endocrinologica**, v. 72, n. 3, p. 551–568, 1973. doi:10.1530/acta.0.0720551.

TAVARES, Gabriel Araújo; ALMEIDA, Larissa Cavalcanti do Amaral; SOUZA, Juliet Araújo de; BRAZ, Glauber Rudá Feitosa; DA SILVA, Matilde Cesiana; LAGRANHA, Cláudia Jacques; DO NASCIMENTO, Elizabeth; SOUZA, Sandra Lopes de. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations. **Behavioural processes**, v. 170, p. 103981, 2020. doi:10.1016/j.beproc.2019.103981.

TAVARES, Gabriel Araújo; DO AMARAL ALMEIDA, Larissa Cavalcanti; SOUZA, Juliet Araújo de; FARIAS, Victor Vasconcelos de; SOUZA, Felipe Leitão de; ANDRADE SILVA, Severina Cassia de; LAGRANHA, Claudia Jacques; KAEFFER, Bertrand; SOUZA, Sandra Lopes de. Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats. **Behavioural brain research**, v. 383, p. 112531, 2020. doi:10.1016/j.bbr.2020.112531.

The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization. Boston, MA: Springer US, 1992. Online-Ressource. (NATO ASI Series). ISBN 9781461533023.

THIELS, E.; ALBERTS, J. R. Milk availability modulates weaning in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, v. 99, n. 4, p. 447–456, 1985.

THIELS, E.; ALBERTS, J. R. Weaning in the Norway rat: relation between suckling and milk, and suckling and independent ingestion. **Developmental psychobiology**, v. 24, n. 1, p. 19–38, 1991. doi:10.1002/dev.420240103.

TOTTENHAM, Nim; HARE, Todd A.; QUINN, Brian T.; MCCARRY, Thomas W.; NURSE, Marcella; GILHOOLY, Tara; MILLNER, Alexander; GALVAN, Adriana; DAVIDSON, Matthew C.; EIGSTI, Inge-Marie; THOMAS, Kathleen M.; FREED, Peter J.; BOOMA, Elizabeth S.; GUNNAR, Megan R.; ALTEMUS, Margaret; ARONSON, Jane; CASEY, B. J. Prolonged institutional rearing is associated with atypically large amygdala volume and difficulties in emotion regulation. **Developmental science**, v. 13, n. 1, p. 46–61, 2010. doi:10.1111/j.1467-7687.2009.00852.x.

TSIGOS, Constantine; KYROU, Ioannis; KASSI, Eva; CHROUSOS, George P. **Endotext: Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology**. South Dartmouth (MA), 2000.

ULRICH-LAI, Yvonne M.; HERMAN, James P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009. doi:10.1038/nrn2647.

VALENCIA-TORRES, Lourdes; OLARTE-SÁNCHEZ, Cristian M.; LYONS, David J.; GEORGESCU, Teodora; GREENWALD-YARNELL, Megan; MYERS, Martin G.; BRADSHAW, Christopher M.; HEISLER, Lora K. Activation of Ventral Tegmental Area 5-HT_{2C} Receptors Reduces Incentive Motivation.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 42, n. 7, p. 1511–1521, 2017. doi:10.1038/npp.2016.264.

VAN DER KOOY, Derek. Area postrema: site where cholecystinin acts to decrease food intake. **Brain Research**, v. 295, n. 2, p. 345–347, 1984. doi:10.1016/0006-8993(84)90982-x.

VAN OPSTAL, A. M.; VAN DEN BERG-HUYSMANS, A. A.; HOEKSMAN, M.; BLONK, C.; PIJL, H.; ROMBOUTS, S. A. R. B.; VAN DER GROND, J. Effect of flavor on neuronal responses of the hypothalamus and ventral tegmental area. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 11250, 2019. doi:10.1038/s41598-019-47771-8.

VENTURA, Alison K. Does Breastfeeding Shape Food Preferences? Links to Obesity. **Annals of nutrition & metabolism**, 70 Suppl 3, p. 8–15, 2017. doi:10.1159/000478757.

VOLKOW, Nora D.; WANG, Gene-Jack; BALER, Ruben D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. **Trends in cognitive sciences**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2011. doi:10.1016/j.tics.2010.11.001.

WADE, G. N. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 88, n. 1, p. 183–193, 1975. doi:10.1037/h0076186.

WALLEN, W. J.; BELANGER, M. P.; WITTNICH, C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2351–2357, 2001. doi:10.1093/jn/131.9.2351.

WANAT, Matthew J.; BONCI, Antonello; PHILLIPS, Paul E. M. CRF acts in the midbrain to attenuate accumbens dopamine release to rewards but not their predictors. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 383–385, 2013. doi:10.1038/nn.3335.

WANG, Qian; ZHANG, Xiaoqian; LENG, Hui; LUAN, Xiao; GUO, Feifei; SUN, Xiangrong; GAO, Shengli; LIU, Xuehuan; QIN, Hao; XU, Luo. Zona incerta projection neurons and GABAergic and GLP-1 mechanisms in the nucleus accumbens are

involved in the control of gastric function and food intake. **Neuropeptides**, v. 80, p. 102018, 2020. doi:10.1016/j.npep.2020.102018.

Weaning from the breast. **Paediatrics & child health**, v. 9, n. 4, p. 249–263, 2004. doi:10.1093/pch/9.4.249.

WEBER, Brittany C.; MANFREDO, Heather N.; RINAMAN, Linda. A potential gastrointestinal link between enhanced postnatal maternal care and reduced anxiety-like behavior in adolescent rats. **Behavioral neuroscience**, v. 123, n. 6, p. 1178–1184, 2009. doi:10.1037/a0017659.

WEI, Nai-Li; QUAN, Zi-Fang; ZHAO, Tong; YU, Xu-Dong; XIE, Qiang; ZENG, Jun; MA, Fu-Kai; WANG, Fan; TANG, Qi-Sheng; WU, Heng; ZHU, Jian-Hong. Chronic stress increases susceptibility to food addiction by increasing the levels of DR2 and MOR in the nucleus accumbens. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 15, p. 1211–1229, 2019. doi:10.2147/NDT.S204818.

YILMAZ, Melis; MEISTER, Markus. Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli. **Current biology : CB**, v. 23, n. 20, p. 2011–2015, 2013. doi:10.1016/j.cub.2013.08.015.

ZANCHI, Davide; DEPOORTER, Antoinette; EGLOFF, Laura; HALLER, Sven; MÄHLMANN, Laura; LANG, Undine E.; DREWE, Jürgen; BEGLINGER, Christoph; SCHMIDT, André; BORGWARDT, Stefan. The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: A systematic review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 80, p. 457–475, 2017. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.06.013.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–432, 1994. doi:10.1038/372425a0.

ZHANG-MOLINA, Calvin; SCHMIT, Matthew B.; CAI, Haijiang. Neural Circuit Mechanism Underlying the Feeding Controlled by Insula-Central Amygdala Pathway. **iScience**, v. 23, n. 4, p. 101033, 2020. doi:10.1016/j.isci.2020.101033.

ZULIAN, Juliana Guimarães; HOSOYA, Larissa Yukari Massarenti; FIGUEIREDO, Priscila Moreira; OGIAS, Daniela; OSAKI, Luciana Harumi; GAMA, Patricia. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. **Scientific reports**, v. 7, p. 45867, 2017. doi:10.1038/srep45867.

ZULIAN, Juliana Guimarães; HOSOYA, Larissa Yukari Massarenti; FIGUEIREDO, Priscila Moreira; OGIAS, Daniela; OSAKI, Luciana Harumi; GAMA, Patricia. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. **Scientific reports**, v. 7, p. 45867, 2017. doi:10.1038/srep45867.

APÊNDICE A- CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Ofício nº 53/18

Recife, 04 de julho de 2018.

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 0020/2018

Certificamos que a proposta intitulada "**Desmame precoce e comportamento alimentar: um estudo do sistema serotoninérgico.**", Registrada com o nº 0020/2018 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 04/07/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/06/2018 a 06/06/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	78
Peso/Idade	Macho 250-300g/180 dias e Femea 200g/120 dias
Sexo	Macho (10) e Femea (68)
Origem	Departamento de Nutrição - UFPE

Atenciosamente,


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

**APÊNDICE B- ARTIGO CIENTÍFICO PRODUTO DIRETO DA TESE
SUBMETIDO A BEHAVIORAL SCIENCES**

Article

Effects of Early Weaning Associated with Alimentary Stress on Emotional and Feeding Behavior of Female Adult *Wistar* Rats.

Víctor Isaac Meléndez Díaz ^{1*}, Juliet Araújo de Souza ¹, Sandra Lopes de Sousa ^{1,2}

¹ Graduate Program of Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; posneuro@ufpe.br

² Graduate Program of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; posnutricao@ufpe.br

* Correspondence: victor.melendez@ufpe.br

Abstract: Maternal lactation proves crucial for mammals' nutrition during their early development, influencing the development of adult physiological mechanisms. Its premature termination has been associated with several disorders, but these have been primarily documented in males, when they are most prevalent in women. Therefore, we submitted adult female *Wistar* rats to EW through maternal separation at age 15 days to acute alimentary stress in the form of visual and olfactory exposition to a cafeteria diet sans consumption for 22 days. We measured standard diet intake and water intake daily and cafeteria diet intake every 7 days. Additionally, we evaluated anxiety using the EPM and measured body weight in similar intervals. Results showed less consumption of cafeteria diet among EW rats on day 2, more time spent in the maze's central area by the EW rats during the basal evaluation and in the maze's open arms by control rats on day 7 when compared to the same group's basal time. No other significant differences were found. These results show the importance of determining the impact that female steroidal gonadal hormones like E2 have upon feeding behavior and anxiety and determining to what degree these parameters are determined by hormonal action.

Citation: Meléndez, V; Araújo, J; Lopes, S. Title. *Behav. Sci.* 2021, 11, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Sandra Lopes de Sousa

Received: date

Accepted: date

Published: date

Keywords: weaning; feeding behavior; female; rats, wistar;

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Knowledge of breastfeeding's importance has evolved considerably over the last few decades. Initially dismissed as a physiological mechanism rendered irrelevant by worldwide advances in food production sanitation and industrialization (1984), this attitude changed considerably once scientific insights revealed how much influence breastfeeding has in modulating mechanisms both physiological (GIUGLIANI; HORTA; LORET DE MOLA; LISBOA; VICTORA, 2015) and otherwise (BOWATTE; THAM; ALLEN; TAN; LAU; DAI; LODGE, 2015). Breastfeeding, or the lack thereof, can influence human physiology to such a degree that infant mortality rates directly correlate with its administration. (SANKAR; SINHA; CHOWDHURY;

BHANDARI; TANEJA; MARTINES; BAHL, 2015). Some of the mechanisms involved are those that regulate intake and food preference, with this particular pairing having important implications for adult life. (VENTURA, 2017; KANARI; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2005). As such, there is great interest in parsing out whether breastfeeding has an influence over other behaviors that affect reward seeking.

One such behavior is anxious behavior. It is one of the most prevalent mental disorders during childhood and it can have a significant impact on a child's functioning. [7] It is a dysfunction in an organism's stress reactivity that is in part mediated by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Both early life stress [8] and early weaning [9] (EW) are directly correlated with anxious-like behavior in rats. Furthermore, early life adverse conditions in rats have a direct effect on food preference [10] and food intake [11] while enhanced maternal care with increased suckling reduces anxious behavior [12]. This posits the question of how much of this effect is due to early or insufficient weaning.

Both anxious disorders and obesity are more prevalent in women than in men. It is possible that steroidal gonadal hormones play a role in this discrepancy. However, female steroidal hormones' effects on both type of behaviors is paradoxical, with 17β -Estradiol (E2 for short) administration having anxiolytic effects and reducing food intake in ovariectomized rats. Furthermore, female animals are oftentimes excluded from studies to eliminate the confounding effect that hormonal differences have. Therefore, there is a great need to research the interactions between environmental and nutritional stressors such as EW and their effects on a female population. As such, we set out to determine the effects of EW and an acute alimentary stressor on the feeding behavior of female Wistar rats, along with testing to see if there is an increase in their anxious behaviors.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

This study was a prospective, randomized, controlled and blinded animal model study based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines [31].

2.2. Animals and Experimental Protocol

2.2.1. Animals

Albino Wistar rats in reproductive age with approximately 200-250 g of weight were used. They were provided by the Breeding Farm of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco. Rats were paired in the ratio of two females for each male. Gestation was confirmed through weight change verification. Once gestation was confirmed, rats were transferred to individual cages and received standard vivarium diet (Labina, Presence ®). After the pups' birth, sexing was undertaken with the goal of forming litters of 8 pups per mother, with male and female pups being distributed per the same ratio

(4:4) whenever possible. 2 female pups per litter were randomly picked to form the experimental groups, each of which was comprised of 8 rats. During the entire experiment, the animals were kept in standard vivarium conditions, at a 22°C(± 1) temperature, under an inverted 12 h light-dark cycle sob ciclo claro-escuro invertido de 12h (lights on at 18h) and food and water ad libitum. Care and management were undertaken following the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the ethics committee on animal experimentation of the Federal University of Pernambuco (UFPE) under the license number 0020/2018 on 07/04/2018.

2.2.2. Early weaning and experimental groups

Experimental groups were determined according to whether the animals were weaned early or not. Early weaning consisted in the early separation of pups from their mothers in a permanent basis starting from the 15th post-natal day, with control animals being weaned on the 30th post-natal day. Early weaned pups received shredded standard vivarium diet until 21 days of age. From the 21th day of age onwards all groups received standard vivarium diet. Early weaned and control groups were thus formed. After weaning, only females were used in this study. They were grouped in pairs in separate cages until experiments began around their 170 days of age. Each subgroup was composed of a total of 8 animals. Therefore, the following experimental groups were made:

- Control Group – weaned on a period natural for its species (30° post-natal day, n=8);
- Early Weaning Group – weaned on the 15° post-natal day (n=8).

2.3. Clinical Analyses

2.3.1 Alimentary stress and cafeteria diet intake before and after stress

Alimentary stress started between 166-168 days of age, between 12h and 12h20. It consisted of visual and olfactory exposition to cafeteria diet (Bauduco® chocolate cookies) for twenty minutes, during 22 consecutive days. The food was wrapped in galvanic mesh (15cmx15cm) that kept animals from consuming it. Intake measurements were carried out during 5 different moments: basal (sans alimentary stress) and on the 2nd, 8th, 15th and 22nd days of alimentary stress. During basal intake measurement, animals weren't exposed previously to cafeteria food wrapped in galvanic mesh; they had 1 hour of free access to it. During stress days, animals had access to the cookie during 1 hour after 20 minutes of alimentary stress. Food intake (g) was quantified through the difference between the amount offered and the remaining amount. During this experiment, animals had free access to water.

2.3.2 Body weight

Body weight was evaluated at the start of the experiment and after that, on a weekly basis, on days 2, 8, 15 and 22 of alimentary stress. A digital weighing balance with a sensibility of 0,001g was used.

2.3.3. Experimental anxiety before and after alimentary stress

Anxiety assessment was carried out using the elevated plus maze model. This test model lasts for 5 minutes and is carried out inside a maze which consists of two open arms (50 x 10cm) and two closed ones (50 x10x 40 cm) which extend from a central platform (10x10cm), with everything at a height of 50 cm above ground level. The coating of the floor, walls and central region is a dark ant-slip material. During the test, the labyrinth was illuminated using low voltage red light (15 W). This experimental model was based on rodents' innate fear of open elevated spaces and preference for closed arms. The test itself consisted in placing the animals individually on the device's central space, with the head facing towards the open arm opposite from the evaluator, and registering data during the following 5 minutes. Time spent in and number of entries into each arm were registered per protocol. An entry was only registered once an animal placed all 4 paws on one of the maze's arms. Each animal's time was measured using a digital chronometer. Time spent in the central platform was calculated using the following formula: $TC = TT - (TBF + TBA)$, where TC is the time spent in the central platform, TT is the test's total time, TBF is time spent in the closed arm and TBA time spent on the open arm.

Using the elevated plus maze test, experimental anxiety has a basal assessment, with stress response being later assessed in four distinct periods during the 22 days of alimentary stress, these being days 1, 7, 14 and 21. Animals were tested for 5 minutes after being subjected to 20 minutes of alimentary stress during these days. The testing period went on from 12h00 to 15h00.

2.3.4. Standard diet intake after alimentary stress

During the 22 days of alimentary stress standard diet intake was measured every 24 hours. 50g of standard diet were offered once the 20 minute alimentary stress period was over. After 24h the remaining food was weighed. This procedure was repeated until the alimentary stress period's end, meaning until the 22nd day. Food intake (g) was quantified as the difference between the amount offered and the remaining amount.

2.3.5. Water intake after alimentary stress

During the 22 days of alimentary stress water intake was measured every 24 hours. Bottles full of water weighing approximately 900g were offered. They were weighed once the 20 minute alimentary stress period was over and weighed once again after 24h. This procedure was repeated until the alimentary stress period's end, meaning until the 22nd day. Water intake was quantified as the difference between the amount offered and the remaining amount in terms of grams of weight.

2.4. Statistical Analysis

Data was presented as median and standard deviation. Clinical analyses were performed by a two-way analysis of variance (ANOVA) and Test-t. The significance value used in every assessment was $p < 0,05$.

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Body Weight

There were no differences in body weight between the control and EW groups at any of the ages assessed. (Figure 1)

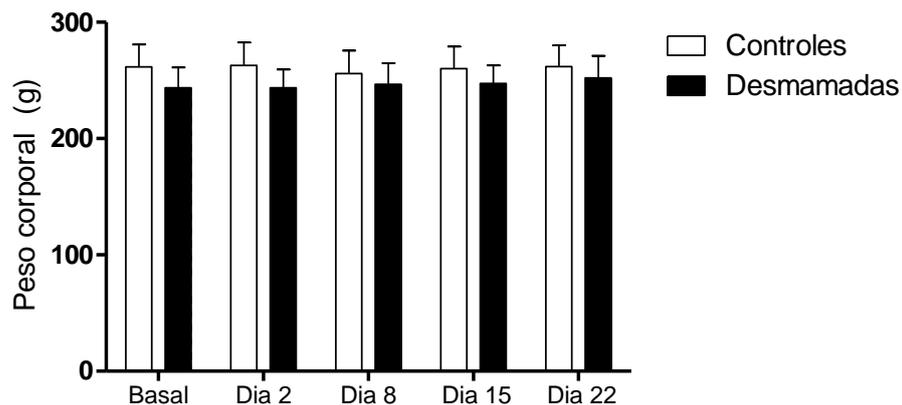


Figure 1. Effect of early weaning associated with chronic stress on body weight of adult rats. The animals' body weight was obtained at ages 166-168 days (basal analysis) and on days 2 (169-171 days of age), 8 (175-177 days of age), 15 (182-184 days of age), and 22 (188-190 days of age) of alimentary stress. ANOVA Two-Way. Bonferroni's post-hoc test $n=8$. Data expressed as mean \pm SD.

3.2. Elevated Plus Maze

There were no differences in time spent in all four arms between the control and early weaned group. However, an analysis of the time spent in the maze's central platform showed that weaned animals spent more time there in the day of basal analyses, before they were exposed to alimentary stress. (Control: $25,5 \pm 12,7$ vs Weaned: $47,9 \pm 22,4$, $p<0,05$) (Figure 2A).

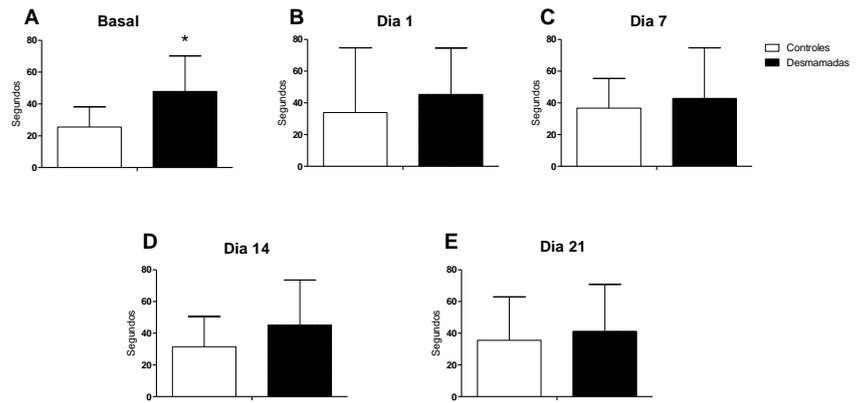


Figure 2. Effect of early weaning associated to chronic stress over time spent in central platform of elevated plus maze. Data was obtained from animals during their 166-168 days of age (basal analysis, Figure 2A) and during days 1 (168-170 days of age, Figure 2B), 7 (174-176 days of age, Figure 2C), 14 (181-183 days of age, Figure 2D) and 21 (187-189 days of age, Figure 2E) of alimentary stress. Test t. $n=8$. Data expressed as mean \pm SD. * $p<0,05$.

An analysis comparing different days showed that the control group spent more time on the open arms on the 7th day when compared to the basal analysis (Basal: $36,5 \pm 15,5$ vs Day 7: $79,2 \pm 38,0$, $p<0,05$) (Figure 3A). There were no differences in the number of entries into each of the four arms between the control group and the weaned group (Figures 3C and 3D).

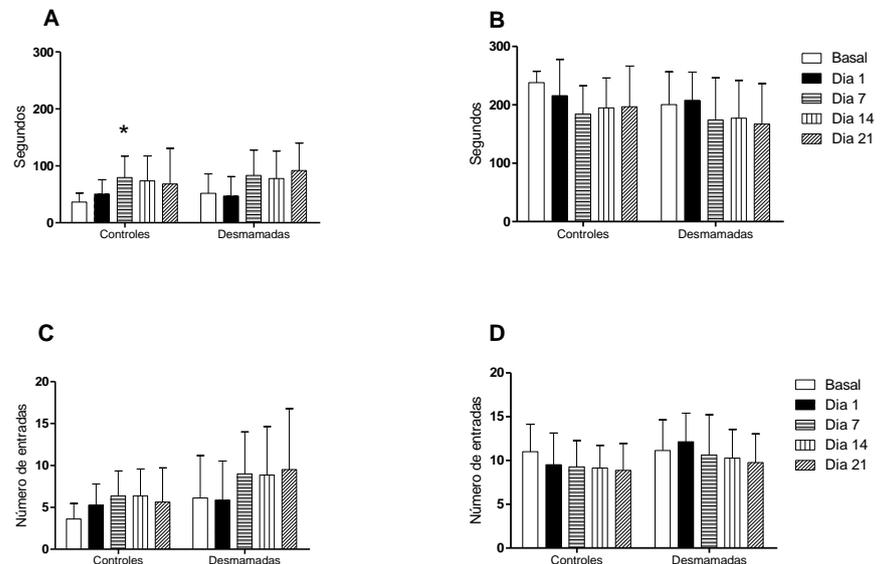


Figure 3. Effect of early weaning associated with chronic stress over time spent in open and closed arms (Figures 3A and 3B respectively) and over number of entries into open and closed arms (Figure 3C and 3D respectively) of elevated plus maze. Data was obtained from animals on their 166-168 days of age (basal analysis) and on days 1 (168-170 days of age), 7 (174-176 days of age), 14 (181-183 days of age) and 21 (187-189

days of age) of alimentary stress. Two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test $n = 8$. Data expressed as mean \pm SD. * $p < 0,05$ vs Basal.

3.3. Cafeteria diet intake

The analysis of chocolate cookie (Bauducco®) intake showed an increase in the intake of the weaned group on the first day after alimentary stress started (control: $3,4 \pm 1,5$ vs weaned: $1,8 \pm 1,3$, $p < 0,05$) (Figure 4B). There were no differences in intake between groups during basal analyses nor on day 7 of alimentary stress.

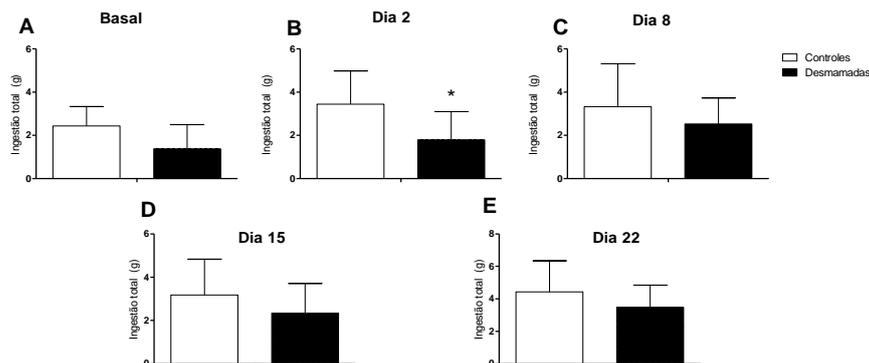


Figure 4. Effect of early weaning associated with chronic stress on chocolate cookie (Bauducco®) intake. Data was obtained from animals on their 166-168 days of age (basal analysis) and on days 2 (169-171 days of age), 8 (175-177 days of age), 15 (182-184 days of age) and 22 (188-190 days of age) of alimentary stress. T Test $n=8$. Data expressed as mean \pm SD. * $p < 0,05$ vs controls.

On D7, corticoid-treated and control wounds displayed thin collagen fibers, which were poorly organized. In the groups treated with copaiba, some denser collagen fibers with a thicker appearance were noted in the wound. These fibers were more parallel to the epithelium and demonstrated a more organized pattern in comparison to the control (* $p < 0.05$) and corticoid group (** $p < 0.01$). (Figure 4.c)

3.4. Standard diet intake

There were no differences in standard diet intake between control and weaned groups on any of the days assessed. However, when an analysis of the data from all the days was carried out, a similar pattern emerged in both groups, where 2 days of lower intake were followed by 5 days with higher intake on the second and third weeks of the 22 days of alimentary stress.

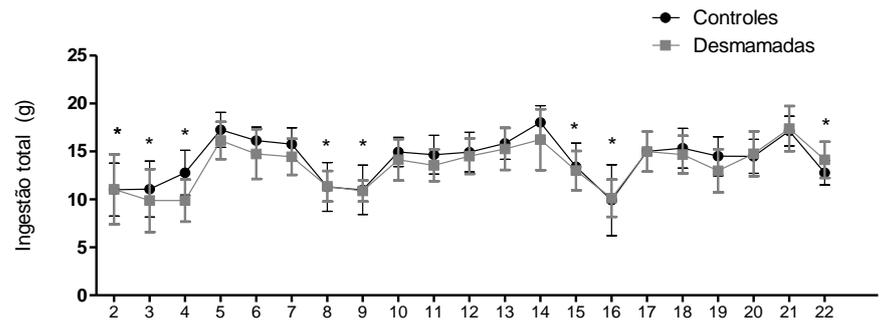


Figure 5. Effect of early weaning associated with chronic stress over standard diet intake. Data was obtained every 24 hrs between days 2 and 22 of alimentary stress. Two-way ANOVA. Bonferroni's post-hoc test $n=8$. Data expressed as mean \pm SD. *Shows the points where both groups showed statistically lower values when compared to the highest levels.

3.5 Water Intake

There was no difference in water intake between the control and weaned groups during any of the days assessed. However, when an analysis of the data from all the days was carried out, a similar pattern emerged in both groups. Intake peaked every 7 days during the 22 days of alimentary stress.

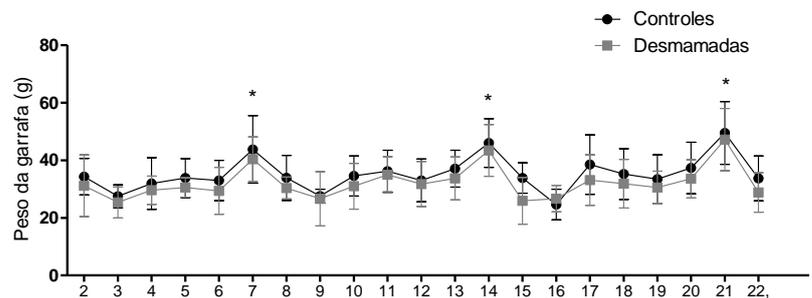


Figure 6. Effect of early weaning associated with chronic stress over water intake. Data was obtained every 24 hrs between days 2 and 7 of alimentary stress. Two-way ANOVA and Bonferroni's post-hoc test $n=8$. Data expressed as mean \pm SD. *Shows the points in which both groups showed statistically higher values when compared to the lowest values, meaning it indicates peaks.

4. Discussion

In the present study, we assessed the feeding and anxious patterns of female Wistar rats subjected to early weaning. Compared to control females, they showed no differences in body weight, in an anxiety test after basal assessments and in standard diet and water intake. There was only a difference in cafeteria diet intake on the second day of acute alimentary stress.

Early Weaning (EW) is a procedure that allows us to evaluate the impact that the absence of maternal milk has on diet and maternal care during a critical moment of a mammal's development, the neonatal

period. On male rats, EW initially causes weight loss during the neonatal period; however, this result reverts during adult age (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011). This effect is in part mediated by the metabolic programming of leptin, with low levels during infancy conditioning leptin resistance during adult age (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011). Leptin acts on a variety of neuroanatomical structures, chief among them the hypothalamus's arcuate nucleus, where it inhibits NPY/AgRP/GABA neurons through ATP-sensitive potassium channels. (BAQUERO; SOLIS; LINDSLEY; KIRIGITI; SMITH; COWLEY; ZELTSER; GROVE, 2014)

The actions of E2 are probably responsible for the difference in results we had when compared to similar studies carried out in males. Male rats subjected to EW show increased body weight during adult age (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011) along with resistance to leptin and higher levels of this hormone. (LIMA; MOURA; PASSOS; NOGUEIRA NETO; REIS; OLIVEIRA; LISBOA, 2011) Curiously enough, when subjected to EW along with alimentary stress, they do not express this increase. Male rats subjected to EW show an increased intake of both standard and cafeteria diet (TAVARES; DO AMARAL ALMEIDA; SOUZA; FARIAS; SOUZA; ANDRADE SILVA; LAGRANHA; KAEFFER; SOUZA, 2020).

Estrogens are a critical factor in body weight regulation. Everything points to food intake being controlled cyclically in a manner correlated with estrogen levels. (TARTTELIN; GORSKI, 1973; TARTTELIN, 1968). Studies carried out with early-weaned female rats show an increase in weight in teenage rats, something that we did not observe in our study. (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020). This is possibly due to serum estrogen levels varying according to the rat's age, these being lower in younger rats. (STEGER; PELUSO, 1982) Lower levels of circulating estrogen promote higher body weight, as demonstrated in ovariectomized rats. (ASARIAN; GEARY, 2002; WALLEN; BELANGER; WITTNICH, 2001). Classic studies have demonstrated that estrogen treatment directly results in weight loss and reduced food intake in ovariectomized rats. (WADE, 1975) It could be that in the present study, the similarity in body weight between both groups was related to a similar lack of change in standard diet intake. Estrogen has an important role mediating energy balance, reducing food intake and increasing energy expenditure. (ECKEL; LANGHANS; KAHLER; CAMPFIELD; SMITH; GEARY, 1998) Early weaning promotes weight gain in male animals but doesn't have a similar effect in females, probably due to estrogen's actions in weight reduction, meaning that estrogen did not allow for EW induced weight gain to take place as it has an antagonistic effect on this variable. It is worth considering that apart from its effects on energy intake, estrogen also stimulates brown adipose tissue thermogenesis through its actions on the ER α receptor. (MARTÍNEZ DE MORENTIN; GONZÁLEZ-GARCÍA; MARTINS; LAGE; FERNÁNDEZ-MALLO; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ; RUÍZ-PINO; LIU; MORGAN; PINILLA; GALLEGOS; SAHA; KALSBECK; FLIERS; BISSCHOP; DIÉGUEZ; NOGUEIRAS; RAHMOUNI; TENA-SEMPERE; LÓPEZ, 2014).

Standard diet intake did not differ between both groups. However, in males subjected to EW there is an important increase in standard diet intake, especially during the dark cycle (TAVARES et al., 2020). It is precisely during the dark period of the circadian cycle that females reduce meal size during estrous (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020), a phase that is preceded by a peak in serum estrogen levels. Females have demonstrated markedly rhythmic behavior during the ovarian cycle. (TARTTELIN; GORSKI, 1973) Reduced food intake during estrous involves cyclical alterations in the neurobiology of meal size control (TARTTELIN; GORSKI, 1973). Additionally, rats show low calorie efficiency (WADE, 1975). In female rats' case, leptin and estrogens interact in such a way that ovariectomized rats show high levels of leptin along with increased body weight (CHU; CHOU; LIU; CHEN; SHYU; CHOU, 1999). Leptin is an anorexigenic hormone. Among estrogens, 17 β -Estradiol (E2 for short) has considerable influence over feeding. (RIVERA; STINCIC, 2018) It plays a role in homeostatic control of feeding behavior by exerting both tonic (DREWETT, 1973) and phasic (ECKEL, 2000) anorexigenic effects. The former is evident in rats without ovaries, which are the main source of estrogens in females, which subsequently show an increased intake (DREWETT, 1973). Phasic inhibition is evident through the fluctuations in intake that happen throughout the estrous cycle (ECKEL, 2000). Along with a decrease in food intake during estrous comes a decrease in meal size. E2's actions over feeding behavior are attributed to that hormone's actions in the hypothalamus and nucleus tractus solitarius (NTS) [111]. Direct administration of E2 into the arcuate nucleus of the hypothalamus directly inhibits NPY/AgRP neurons, which are orexigenic. This results in reduced food intake and body weight as well as an increase in physical activity. (AHDIEH; WADE, 1982) This action is mediated by the ER α receptor which acts both through nuclear signaling (GRUBER; GRUBER; GRUBER; WIESER; HUBER, 2004) and through membrane signaling in mice and guinea pigs. (QIU; BOSCH; TOBIAS; KRUST; GRAHAM; MURPHY; KORACH; CHAMBON; SCANLAN; RØNNEKLEIV; KELLY, 2006)

We know that estrogens reduce food intake; however, their effects on food reward are much less clear, specifically when it comes to food's motivational properties. Among male rats it has been observed that EW increases cafeteria diet intake (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020). They show a higher increase of dopaminergic and serotonergic receptors associated with higher cafeteria diet consumption. (TAVARES; ALMEIDA; SOUZA; BRAZ; DA SILVA; LAGRANHA; DO NASCIMENTO; SOUZA, 2020) However, in this study we did not observe changes in female rats' intake regardless of what kind of diet they were offered, whether it was standard or cafeteria. Rats are more motivated to work for cocaine during estrous when compared to other phases of the cycle. (Carroll et al., 2002; Roberts et al., 1989). This is relevant as cerebral circuitry of food motivation overlaps with that of drug addiction. (VOLKOW; WANG; BALER, 2011) However, in females it is probable that reward mechanisms for drugs and food are more distinct from each other than in males. (HM Rivera1 and TL Stincic, 2018). Cafeteria diet intake in females is due more to its high caloric

content than to its palatable properties. (GALEA, 2001) Estrogens decrease food intake (Asarian and Geary, 2013) while the use of recreational drugs increases serum estrogen levels (Becker and Hu, 2008). Food motivation varies along the estrous cycle, with the least amount of food motivation registered during estrous. (114) During this same experiment the removal of the ovaries increased food motivational behavior. It also demonstrated that estrogens act directly on mesolimbic reward of circuits that reduce food reward, as direct E2 microinjections in the ventral tegmental area (VTA) reduced food reward behavior. (114) Additionally, E2 decreases saccharose motivation in rats (RICHARD; LÓPEZ-FERRERAS; ANDERBERG; OLANDERSSON; SKIBICKA, 2017) while not increasing the effects of food reward. (MARTINEZ; GROSS; HIMMLER; EMMITT; PETERSON; ZLEBNIK; FOSTER OLIVE; CARROLL; MEISEL; MERMELSTEIN, 2016) This is mediated by a mGluR5 dependent mechanism that selectively increases motivation for cocaine but not for saccharose. (MARTINEZ; GROSS; HIMMLER; EMMITT; PETERSON; ZLEBNIK; FOSTER OLIVE; CARROLL; MEISEL; MERMELSTEIN, 2016) Going from there, we may conjecture that the presence of E2 bestows a protective effect against acute alimentary stress. On top of this, orexins have differing effects on sucrose intake. [200]

The instance of reduced cafeteria diet we observed among EW rats on day 2 could be explained by higher levels of anxiety. As previously mentioned, E2 reduces the rewarding effects of sucrose and it was present in both groups. Meanwhile, some studies have shown an increase in anxious behaviors among EW rodents (KANARI; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2005; SHIMOZURU; KODAMA; IWASA; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2007). Considering there were no differences either in the elevated plus maze or in the standard diet intake results, we may hypothesize that the difference in intake we observed might be a result of EW rats being exposed to a non-familiar stimulus. This would be consistent with the principles behind the Novelty Suppressed Feeding test, which measures latency to feeding in an unfamiliar environment, or in this case stimulus. (CAMPOS; FOGAÇA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2013) Evaluating the effect that an anxiolytic agent would have over this behavior could help clarify this possibility.

During our experiment, there were no differences in the time spent in the open arms of the elevated plus maze between both groups. Our results are consistent with results from previous studies carried out with EW rats, where male rats spent less time in the open arms and entered them less frequently, while there were no differences in either time spent or frequency entering between both female groups. (ITO; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2006) Also, there were similarities with studies carried out in ovariectomized mice where doses of E2 had an anxiolytic effect, increasing the time spent in open arms of the maze during the elevated plus maze test (KASTENBERGER; LUTSCH; SCHWARZER, 2012). Based on that, we may conjecture that these results are the product of the anxiolytic property of estrogens, E2 chief among them. These actions vary according to which receptor they activate. For example, studies carried out in knockout mice found that the ER α receptor regulates the hormone's anxiogenic effect, while ER β knockouts and agonists like diarylpropionitrile and WAY-200070 increase anxious

symptoms in tests like the elevated plus maze in both rats and mice. Furthermore, the GPR30 membrane receptor is involved in the stress response, since it shows increased immunoreactivity in the basal amygdala in ovariectomized mice subjected to stress. This results in a decrease in time spent on the EPM's open arms. (BORROW; HANDA, 2017) The increase in time spent in the maze's central area that we observed among EW rats during basal testing is a curious datum that could point towards changes in unknown behavioral parameters as a result of EW. Until now, time spent in that area has been correlated with increased impulsivity during operant conditioning tasks. (RICO; HURTADO-PARRADO; VÁSQUEZ-SEPÚLVEDA; FONSECA; CARDONA, 2017)

As for water intake, we know that it is prandial in rats, with 70-85% of spontaneous intake directly related to feeding. (FITZSIMONS; LE MAGNEN, 1969) This could be the reason why there were no differences in water intake during our experiment, since water intake closely mirrored food intake. Nevertheless, E2 is also involved in the regulation of this behavior. It has an anti-dipsogenic effect, even though that effect seems to be mediated more by organizational differences, since hormone injections don't have the same effect on male rats. The structures that regulate this effect are mainly concentrated in the hypothalamus. These include the Subfornical Organ, the Lateral Hypothalamus, the Paraventricular Nucleus and the Median Preoptic Nucleus. (SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997) Even though water intake in rats is prandial, E2's anti-dipsogenic effects don't result in a decrease on food intake. Central hormone injections result in a decrease in water intake in rats, especially when administered on the lateral hypothalamus, (SUZUKI; KOHNO; SAKURADA; TADANO; KISARA, 1982), while chronic subcutaneous administration increases water intake (CHOI; HARTZELL; AZAIN; BAILE, 2002).

Our study shows what we believe to be a protective effect of gonadal steroidal hormones against feeding behavior dysregulation and anxiety-like symptoms among female rats subjected to early weaning and alimentary stress. While the results are consistent with previous literature, they appear to be contradictory with the reality of higher prevalence of feeding and anxiety disorders among women. Our results show the importance of continued research into the complex interactions between early weaning, diverse diets and hormonal states. The use of ovariectomization, specific estrogenic receptor antagonism at different ages and anxiolytic agents could help parse out these interactions and possibly bring about new dietary interventions and pharmacological treatments to combat the illnesses that result from their imbalance.

Author Contributions: Conceptualization, V.M. and J.A.; methodology, V.M., J.A., and S.L.; validation, R.L. and M.D.M.; formal analysis, V.M. and J.A.; investigation, V.M. and J.A.; resources, S.L.; writing—original draft preparation, V.M.; writing—review and editing, S.L., V.M. and J.A.; supervision, J.A. and S.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil(CAPES)-finance code 001 and supported by Pró-Reitoria de *Pesquisa* e Pós-Graduação da UFPE (PROPESP/UFPE, Brazil).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the CEUA of UFPE (protocol code 0020/2018 06/06/2018).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to [insert reason here].

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), to the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Amazônia Oriental) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

EW	Early Weaning
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
UFPE	Federal University of Pernambuco
CEUA	Ethics Committee on the Use of Animals
CAPES	Coordination for Improvement of Higher Education Personnel
CNPq	Brazilian National Council for Scientific and Technological Development
PROCAD	National Academic Cooperation Program

References

1. Report of the Task Force on the Assessment of the Scientific Evidence Relating to Infant-Feeding Practices and Infant Health. *Pediatrics* **1984**, *74*, 579–762.
2. Giugliani, E.R.J.; Horta, B.L.; Loret de Mola, C.; Lisboa, B.O.; Victora, C.G. Effect of breastfeeding promotion interventions on child growth: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* **2015**, *104*, 20–29, doi:10.1111/apa.13160.
3. Bowatte, G.; Tham, R.; Allen, K.J.; Tan, D.J.; Lau, M.; Dai, X.; Lodge, C.J. Breastfeeding and childhood acute otitis media: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* **2015**, *104*, 85–95, doi:10.1111/apa.13151.
4. Sankar, M.J.; Sinha, B.; Chowdhury, R.; Bhandari, N.; Taneja, S.; Martines, J.; Bahl, R. Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* **2015**, *104*, 3–13, doi:10.1111/apa.13147.
5. Ventura, A.K. Does Breastfeeding Shape Food Preferences? Links to Obesity. *Ann. Nutr. Metab.* **2017**, *70 Suppl 3*, 8–15, doi:10.1159/000478757.
6. Kanari, K.; Kikusui, T.; Takeuchi, Y.; Mori, Y. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. *Behav. Brain Res.* **2005**, *156*, 45–52, doi:10.1016/j.bbr.2004.05.008.
7. Lima, N.d.S.; Moura, E.G. de; Passos, M.C.F.; Nogueira Neto, F.J.; Reis, A.M.; Oliveira, E. de; Lisboa, P.C. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 1405–1413, doi:10.1017/S0007114510005064.
8. Baquero, A.F.; Solis, A.J. de; Lindsley, S.R.; Kirigiti, M.A.; Smith, M.S.; Cowley, M.A.; Zeltser, L.M.; Grove, K.L. Developmental switch of leptin signaling in arcuate nucleus neurons. *Journal of Neuroscience* **2014**, *34*, 9982–9994, doi:10.1523/JNEUROSCI.0933-14.2014.
9. Tavares, G.A.; do Amaral Almeida, L.C.; Souza, J.A. de; Farias, V.V. de; Souza, F.L. de; Andrade Silva, S.C. de; Lagranha, C.J.; Kaeffer, B.; Souza, S.L. de. Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats. *Behav. Brain Res.* **2020**, *383*, 112531, doi:10.1016/j.bbr.2020.112531.

10. Tarttelin, M.F.; Gorski, R.A. The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **1973**, *72*, 551–568, doi:10.1530/acta.0.0720551.
11. Tarttelin, M.F. Cyclical variations in food and water intakes in ewes. *J. Physiol.* **1968**, *195*, 29P-31P.
12. Tavares, G.A.; Almeida, L.C.d.A.; Souza, J.A. de; Braz, G.R.F.; da Silva, M.C.; Lagranha, C.J.; do Nascimento, E.; Souza, S.L. de. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT-system modulations. *Behav. Processes* **2020**, *170*, 103981, doi:10.1016/j.beproc.2019.103981.
13. Steger, R.W.; Peluso, J.J. Effects of age on hormone levels and in vitro steroidogenesis by rat ovary and adrenal. *Exp. Aging Res.* **1982**, *8*, 203–208, doi:10.1080/03610738208260367.
14. Asarian, L.; Geary, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm. Behav.* **2002**, *42*, 461–471, doi:10.1006/hbeh.2002.1835.
15. Wallen, W.J.; Belanger, M.P.; Wittnich, C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2351–2357, doi:10.1093/jn/131.9.2351.
16. Wade, G.N. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1975**, *88*, 183–193, doi:10.1037/h0076186.
17. Eckel, L.A.; Langhans, W.; Kahler, A.; Campfield, L.A.; Smith, F.J.; Geary, N. Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in female rats. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, R186–93, doi:10.1152/ajpregu.1998.275.1.R186.
18. Martínez de Morentin, P.B.; González-García, I.; Martins, L.; Lage, R.; Fernández-Mallo, D.; Martínez-Sánchez, N.; Ruiz-Pino, F.; Liu, J.; Morgan, D.A.; Pinilla, L.; et al. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 41–53, doi:10.1016/j.cmet.2014.03.031.
19. Chu, S.-C.; Chou, Y.-C.; Liu, J.-Y.; Chen, C.-H.; Shyu, J.-C.; Chou, F.-P. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sciences* **1999**, *64*, 2299–2306, doi:10.1016/s0024-3205(99)00181-2.
20. Rivera, H.M.; Stincic, T.L. Estradiol and the control of feeding behavior. *Steroids* **2018**, *133*, 44–52, doi:10.1016/j.steroids.2017.11.011.
21. Drewett, R.F. Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat. *Animal Behaviour* **1973**, *21*, 772–780, doi:10.1016/S0003-3472(73)80103-4.
22. Eckel, L. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol. Behav.* **2000**, *70*, 397–405, doi:10.1016/S0031-9384(00)00278-X.
23. Ahdieh, H.B.; Wade, G.N. Effects of hysterectomy on sexual receptivity, food intake, running wheel activity, and hypothalamic estrogen and progesterin receptors in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1982**, *96*, 886–892.
24. Gruber, C.J.; Gruber, D.M.; Gruber, I.M.L.; Wieser, F.; Huber, J.C. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, *15*, 73–78, doi:10.1016/j.tem.2004.01.008.
25. Qiu, J.; Bosch, M.A.; Tobias, S.C.; Krust, A.; Graham, S.M.; Murphy, S.J.; Korach, K.S.; Chambon, P.; Scanlan, T.S.; Rønnekleiv, O.K.; et al. A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 5649–5655, doi:10.1523/JNEUROSCI.0327-06.2006.
26. Volkow, N.D.; Wang, G.-J.; Baler, R.D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn. Sci.* **2011**, *15*, 37–46, doi:10.1016/j.tics.2010.11.001.
27. Galea, L. High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning, stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory. *Behav. Brain Res.* **2001**, *126*, 115–126, doi:10.1016/s0166-4328(01)00255-8.
28. Richard, J.E.; López-Ferreras, L.; Anderberg, R.H.; Olandersson, K.; Skibicka, K.P. Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior. *Psychoneuroendocrinology* **2017**, *78*, 193–202, doi:10.1016/j.psychneuen.2017.01.014.
29. Martinez, L.A.; Gross, K.S.; Himmler, B.T.; Emmitt, N.L.; Peterson, B.M.; Zlebnik, N.E.; Foster Olive, M.; Carroll, M.E.; Meisel, R.L.; Mermelstein, P.G. Estradiol Facilitation of Cocaine Self-Administration in Female Rats Requires Activation of mGluR5. *eNeuro* **2016**, *3*, doi:10.1523/ENEURO.0140-16.2016.
30. Shimozuru, M.; Kodama, Y.; Iwasa, T.; Kikusui, T.; Takeuchi, Y.; Mori, Y. Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of Wistar rats. *Dev. Psychobiol.* **2007**, *49*, 343–350, doi:10.1002/dev.20202.

31. Campos, A.C.; Fogaça, M.V.; Aguiar, D.C.; Guimarães, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz. J. Psychiatry*. **2013**, *35 Suppl 2*, S101-11, doi:10.1590/1516-4446-2013-1139.
32. Ito, A.; Kikusui, T.; Takeuchi, Y.; Mori, Y. Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. *Behav. Brain Res*. **2006**, *171*, 87–93, doi:10.1016/j.bbr.2006.03.023.
33. Kastenberger, I.; Lutsch, C.; Schwarzer, C. Activation of the G-protein-coupled receptor GPR30 induces anxiogenic effects in mice, similar to oestradiol. *Psychopharmacology (Berl)* **2012**, *221*, 527–535, doi:10.1007/s00213-011-2599-3.
34. Borrow, A.P.; Handa, R.J. Estrogen Receptors Modulation of Anxiety-Like Behavior. *Vitam. Horm.* **2017**, *103*, 27–52, doi:10.1016/bs.vh.2016.08.004.
35. Rico, J.L.; Hurtado-Parrado, C.; Vásquez-Sepúlveda, J.; Fonseca, J.; Cardona, Á. El tiempo en el área central del laberinto en cruz elevado correlaciona con medidas relacionadas a impulsividad durante una tarea operante. *Univ Psychol* **2017**, *15*, doi:10.11144/Javeriana.upsy15-5.tcae.
36. Fitzsimons, T.J.; Le Magnen, J. Eating as a regulatory control of drinking in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1969**, *67*, 273–283, doi:10.1037/h0026772.
37. Shughrue, P.J.; Lane, M.V.; Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **1997**, *388*, 507–525, doi:10.1002/(sici)1096-9861(19971201)388:4<507:aid-cne1>3.0.co;2-6.
38. Suzuki, T.; Kohno, H.; Sakurada, T.; Tadano, T.; Kisara, K. Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1982**, *17*, 249–253, doi:10.1016/0091-3057(82)90078-8.
39. Choi, Y.-H.; Hartzell, D.; Azain, M.J.; Baile, C.A. TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol. Behav.* **2002**, *77*, 1–4, doi:10.1016/S0031-9384(02)00784-9.