

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

ANDRÉ DE NORONHA DANTAS BENITZ

**Efeitos da Manipulação Neonatal sobre a Reatividade ao Sabor
Doce em Fêmeas: Estudo da resposta pré e pós púbere**

**PORTO ALEGRE
2014**

ANDRÉ DE NORONHA DANTAS BENITZ

**Efeitos da Manipulação Neonatal sobre a Reatividade ao Sabor
Doce em Fêmeas: Estudo da resposta pré e pós púbere**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Dalmaç
Co-orientadora: Dra. Grasielle Kincheski

PORTO ALEGRE
2014

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa Dra Carla Dalmaz, pela oportunidade, dedicação, carinho, profissionalismo e por todo aprendizado.

À minha co-orientadora, Dra Grasielle Kincheski, por toda atenção, ideias e ajuda com dúvidas cruéis.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia do Estresse, o nosso lab 37, por todo apoio e ajuda, mas também pela amizade e pelas risadas.

À coordenação e à secretaria do Programa de Pós-graduação em Neurociências pela prontidão e ajuda nos momentos mais burocráticos.

Aos profissionais do Biotério do Departamento de Bioquímica, pelo profissionalismo e dedicação.

Aos órgãos financiadores, por todo suporte à execução deste projeto.

À banca examinadora, pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho, tão importante para minha formação.

Aos meus pais, Jorge e Beth, por tudo que sei e por tudo que sou, por me colocarem nesse momento com muita dedicação, amor e carinho.

Aos meus irmãos, Daniel e Leonardo, pela companhia desde o início da vida, por todos os momentos compartilhados.

Aos meus familiares, avós, tios e tias, primos e primas, por todo aquele carinho e apoio que só uma família pode dar.

Aos amigos, do colégio e da universidade, pelo carinho, apoio e por todas as memórias que consolidamos.

À minha paixão, Camila, por todo amor, amizade, paciência, carinho e por todos os momentos maravilhosos que passamos e passaremos juntos.

Resumo

Os primeiros dias de vida de um animal caracterizam uma fase crucial para seu desenvolvimento neuroanatômico e neurofisiológico, e intervenções nesse período podem gerar modificações neurais persistentes nos animais adultos. O procedimento de manipulação neonatal, que envolve uma breve separação dos filhotes da companhia de sua mãe nos primeiros dias de vida, gera alterações comportamentais características, como uma resposta de medo atenuada a ambientes novos, alterações no comportamento sexual e menor resposta a estresse. Adicionalmente, alguns estudos observaram maior consumo de alimento palatável nos animais manipulados, sem encontrar alteração no consumo da ração padrão. Este comportamento poderia ser resultado de alterações nos mecanismos hedônicos destes animais. Poucos estudos sobre manipulação neonatal e respostas hedônicas utilizam ratos fêmeas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre a reação facial afetiva à administração de soluções de sacarose em ratos fêmeas pré-púberes e adultas, manipuladas no período neonatal, comparadas com ratas não manipuladas, avaliando-se também o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase e do receptor D2 da dopamina no núcleo accumbens. O protocolo de manipulação neonatal foi realizado dos dias 1 a 10 de vida, sendo o dia do nascimento considerado dia 0. Os animais foram colocados em um recipiente dentro de uma incubadora a 32°C por 10 min/dia, sem contato físico com a genitora. Somente fêmeas foram utilizadas para este trabalho. Foi realizado um teste de reatividade ao sabor, que consiste de filmagens das expressões faciais do animal em resposta à administração oral de solução, tendo sido utilizadas quatro concentrações de sacarose (0,03M; 0,1M; 0,3M; 1M) para os animais jovens e duas concentrações de sacarose (0,1M e 0,3M) para os animais adultos. Nos animais adultos o ciclo estral foi avaliado para correlacionar com os resultados dos testes comportamentais. Os resultados do presente estudo demonstraram uma maior reatividade ao sabor doce nos animais manipulados quando testados na fase pré-púbere. Esta resposta pode estar relacionada a modificações nos mecanismos hedônicos como resultado da manipulação neonatal. Porém, não foi encontrada diferença estatística para a reatividade ao sabor doce entre animais adultos dos grupos controle e manipulado. Adicionalmente, a avaliação do imunoconteúdo de receptor D2 e da enzima tirosina hidroxilase não revelou diferença estatística significativa entre os grupos controle e manipulado, tanto para os animais jovens quanto para os adultos. Estes resultados podem ser indicativos de que o sistema dopaminérgico não está relacionado com as modificações nas respostas hedônicas observadas nas fêmeas jovens. Concluindo, a manipulação neonatal gerou animais mais responsivos à sacarose na idade jovem, porém, estas alterações foram revertidas nos animais adultos.

Abstract

The neonatal period is a crucial phase for the neuroanatomical and neurophysiological development, and interventions within this period can generate long-lasting neural modifications. Neonatal handling, consisting of a brief maternal separation, can result in behavioral alterations such as diminished neophobia, sexual behavior alterations and reduced stress response. Furthermore, these animals also ingest more palatable food than control animals, without alterations in the regular lab chow consumption. Such behavior could be a result of modifications within brain reward mechanisms. There have been only a few studies about neonatal handling and response to reward using female rats. Therefore, the purpose of the present study was to determine the effects of neonatal handling on affective facial reactions to sucrose solutions in peripubertal and adult female rats. We also examined nucleus accumbens enzyme tyrosine hydroxylase and dopamine D2 receptor immunocontent. Handling procedures were carried out from the 1st day to the 10th day after birth. The pups were placed in a small plastic box inside an incubator at 32°C for 10 min daily. Only female rats were used. Behavioral tests were performed during the peripuberty period and on adults. Orofacial reactions after sucrose solution delivery were recorded on a digital camera for the taste reactivity analysis. The peripubertal animals (~28 days) received four different sucrose concentrations (0,03M; 0,1M; 0,3M; 1M), while the adult animals (>60 days) received two sucrose concentrations (0,1M; 0,3M). Estrous cycle was accessed before tests in adult females for further analysis. The present results show that responsivity to sweet solutions in peripuberty was higher in animals handled during the neonatal period. This higher response could be due to modifications in reward mechanisms as a result of neonatal handling. No statistical difference was found for the adult animals when compared to non-handled. In addition, no statistical difference was found for tyrosine hydroxylase and dopamine D2 receptor immunocontent in both peripubertal and adult animals. Thus, it appears that the dopaminergic system is not related to the handling alterations in peripubertal hedonic responses. In conclusion, neonatal handled female rats show higher reward responses to sucrose solutions during peripuberty. However, this effect seems to be reverted in adult handled animals.

Abreviaturas

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico

ATV – Área Tegmentar Ventral

CE – Ciclo Estral

CRH – Hormônio Liberador de Corticotropina

D1 – Receptor de Dopamina Tipo 1

D2 – Receptor de Dopamina Tipo 2

D3 – Receptor de Dopamina Tipo 3

DA - Dopamina

DAMGO – Encefalina [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]

DOPAC – Ácido 3,4-diidroxifenilacético

GABA – Ácido Gama-aminobutírico

HPA – Hipocampo-pituitária-adrenal

MN – Manipulação Neonatal

NAcc – Núcleo Accumbens

TRS – Teste de Reatividade ao Sabor

TH – Enzima Tirosina Hidroxilase

Sumário

Introdução.....	1
Período de Hiporresponsividade ao Estresse.....	1
Manipulação Neonatal.....	2
Mecanismos de Recompensa.....	4
Teste de Reatividade ao Sabor.....	6
Influência Hormonal em Fêmeas.....	8
Objetivos.....	11
Materiais e Métodos.....	12
Resultados.....	16
Teste de Reatividade ao Sabor.....	16
<i>Western Blot</i>	23
Discussão.....	26
Conclusões.....	31
Referências bibliográficas.....	32

Introdução

Período de Hiporresponsividade ao Estresse

O pesquisador John Paul Scott (1958) declarou que “todos os animais sociais estudados até agora demonstram um período limitado no qual o grupo com o qual o indivíduo irá formar relações sociáveis é determinado”. O autor conjecturou que deveria haver uma base fisiológica para essas alterações precoces que persistiriam até a vida adulta dos indivíduos, o que veio a corroborar com as modificações observadas em animais manipulados quando filhotes. Levine (1957) utilizou um protocolo de intervenção neonatal no qual os animais eram manipulados do dia 1 ao dia 20 após o nascimento. Os animais eram colocados diariamente por 3 minutos em um recipiente fora da gaiola, longe da mãe, mas retornavam ao contato desta após a intervenção. Neste estudo ele observou um aumento do peso adrenal nos animais não-manipulados quando comparados com o grupo manipulado, após administração intraperitoneal de 7,5ml/100g de glicose. Diversos estudos foram realizados no período neonatal. Levine sugeriu que haveria uma janela temporal crítica para que estas intervenções fossem efetivas, corroborando com a Hipótese do Período Crítico (Scott, 1958). Outros trabalhos da época já sugeriam uma influência do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) nos efeitos observados (Sayers et al., 1946; Bovard, 1958; Levine e Lewis, 1959, Levine e Lewis, 1963).

Haltmeyer e colaboradores (1966) realizaram um experimento avaliando a curva dose-resposta da corticosterona adrenal e da plasmática. Os animais eram expostos a um estímulo estressor (choque elétrico ou térmico) ou nenhum (controle) e eram imediatamente sacrificados. Dessa forma foram obtidas dosagens de corticosterona nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 21. Este trabalho demonstrou uma resposta de esteroides nos primeiros dias de vida, contradizendo a hipótese de período não responsivo ao estresse de Schapiro e colaboradores (1962). Aparentemente a maturação adrenal ocorre anteriormente ao nascimento, mas está sujeita a modificações nas primeiras semanas de vida do animal. No ano seguinte, Levine realizou um experimento avaliando duas janelas temporais de intervenção neonatal. Os animais foram manipulados nos 10 primeiros dias de vida ou nos 20 primeiros dias de vida (Levine, 1967). O estudo demonstrou que os animais manipulados apresentam menores níveis de corticosterona plasmática quando apresentados a estímulo novo aos 21 dias de vida, tanto quando manipulados por 10 ou 20 dias. Estes resultados (Haltmeyer et al., 1966; Levine, 1967) indicaram que o período crucial para modificações da resposta a estímulos estressores envolve a primeira semana de vida do animal. Levine (1970) observou uma grande atividade adrenal, altas concentrações plasmáticas e glandulares de corticosterona nos primeiros dias de vida do animal. Logo após há uma grande diminuição da atividade adrenal, permanecendo pouco responsiva até por volta dos 15/18 dias de vida.

Estes estudos sobre a atividade do eixo HPA durante o período neonatal demonstraram um padrão característico, num período que foi denominado de Período de Hiporresponsividade ao Estresse (Sapolsky e Meaney, 1986). Nesta fase há uma diminuição da resposta do eixo HPA aos estímulos nocivos (Haltmeyer et al., 1966; Bartova, 1968). Essa diminuição é caracterizada pela exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides na hipófise e pela diminuição da sensibilidade da glândula adrenal ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (Yoshimura et al., 2003). Animais que sofreram manipulação neonatal demonstram, quando adultos, menor elevação dos níveis basais de corticosterona plasmática em resposta a estressores e maior resiliência (Levine et al., 1967; Meerlo et al., 1999; Plotsky e Meaney, 1993). Entretanto, animais manipulados e não-manipulados apresentam níveis basais semelhantes de corticosterona, ou seja, a diferença parece estar em uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central à retroalimentação negativa da adrenal (Levine, 1994), sendo que foi reportado um elevado número de receptores de glicocorticóides hipocampais nesses animais (Anisman et al., 1998). Em animais adultos previamente submetidos à manipulação neonatal, foi observada uma maior concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo (Meaney et al., 1989) e uma diminuição da excitação mediada pela amígdala na resposta do eixo HPA (De Kloet et al., 1998). Estudos demonstraram persistência das alterações do eixo HPA em ratos de 24 e 26 meses (Meaney et al., 1988, 1991). A manipulação neonatal aumenta a expressão de receptores para hormônio liberador de corticotropina (CRH) e $\alpha 2$ adrenorreceptores na amígdala e no *locus ceruleus*, regiões importantes para a resposta ao medo (Caldji et al., 1998), assim como para glicocorticóides no hipocampo e no córtex frontal, envolvidos na regulação da atividade do eixo HPA (Francis et al., 1996).

Manipulação Neonatal

Pesquisadores do *Wistar Institute of Anatomy and Biology at Philadelphia* sugeriram que ratos albinos (de laboratório) manipulados possuem melhor capacidade de lidar com certas situações envolvendo estressores experimentais (Greenman e Duhring, 1931). Isto levou ao interesse de diversos pesquisadores sobre o que estaria sendo modificado nestes animais, de forma a torná-los mais calmos. Weininger (1954) demonstrou que animais manipulados por 21 dias após o desmame (após os 23 dias de vida) tem maior ganho de peso, maior tamanho corporal, menores danos cardiovascular e gastrointestinais em resposta a estresse grave quando comparados com um grupo controle não-manipulado. Em outro trabalho (Ruegamer et al., 1954) os animais foram manipulados na idade adulta diariamente por 10 min durante 5 semanas, sendo observado maior aumento de peso do que no grupo controle, sem, contudo, diferença estatística na quantidade de alimento consumido, sugerindo um melhor aproveitamento metabólico. Bovard (1954) postulou então a hipótese de que os animais manipulados tinham melhor capacidade de lidar com estresse devido a um

limiar mais alto de sua reatividade emocional, resultado da manipulação. Levine (1957) concluiu que “a ausência de estímulos extrínsecos na infância deixa os animais (não-manipulados) mais susceptíveis a distúrbios emocionais perante estímulos novos”. Estes primeiros trabalhos trouxeram indícios de que a manipulação gerava animais menos responsivos a estímulos estressores.

Diversas hipóteses surgiram sobre o que seria o estímulo principal que geraria as modificações observadas na manipulação neonatal (MN). Diversos trabalhos demonstraram a influência de diferentes estímulos estressores como a magnitude ou duração da intervenção neonatal (Denenberg, 1959), a exposição ao frio (Schaefer et al., 1962), as diferenças nos cuidados parentais (Ressler, 1962), choque elétrico (Denenberg e Smith, 1963), a manipulação da mãe ao longo da gestação (Ader e Conklin, 1963), a manipulação neonatal em diferentes períodos (Cowley e Widdowson, 1965). Em uma ótima revisão, Russell (1971) destacou quatro hipóteses para explicar a influência da manipulação neonatal: a Hipótese de Ação Direta, a Hipótese do Resfriamento, a Hipótese do Comportamento Materno e a Hipótese do Estresse. A Hipótese da Ação Direta considera o fato de que o neonato não possui visão ou olfato completamente formados, então o estímulo tátil seria muito importante na manipulação neonatal, corroborando com trabalhos que não encontraram efeito para estímulos visuais e auditivos nos neonatos (Levine, 1962; Spence e Mailer, 1962). A Hipótese do Resfriamento versa sobre o papel da diminuição da temperatura do neonato durante o procedimento de manipulação. É muito interessante porque os animais recém-nascidos possuem baixo controle térmico e alta relação superfície/volume, estando muito sujeitos à alterações de temperatura. A Hipótese do Comportamento Materno se baseia na possível alteração da relação da mãe com a ninhada manipulada. Contudo, não foi observado efeito em uma pesquisa que envolvia a retirada da mãe durante 6h diárias durante os 21 dias de amamentação (Schaefer, 1957). É interessante observar que o cuidado materno possui componentes de ação direta e relação com controle térmico da ninhada. A Hipótese do Estresse é a mais abrangente, pois considera o fato de que estímulos estressores no período neonatal aumentam a capacidade de lidar com estresse na vida adulta, ou seja, os diferentes parâmetros observados nas outras hipóteses podem estar influenciando o desenvolvimento do neonato de forma conjunta.

Avaliando um importante componente da relação mãe/filhote, Bell e colaboradores (1971) observaram o padrão de vocalizações de animais da espécie *Peromyscus maniculatus baird* quando manipulados. Foi demonstrado que os animais manipulados vocalizam mais, emitindo vocalizações em mais alta frequência e maior duração média. Filmagens dos animais quando retornavam ao ninho mostraram que o comportamento materno só ocorria durante as vocalizações. Há uma relação entre temperatura corporal e vocalizações, a partir de determinada temperatura as vocalizações cessam, provavelmente por diminuição do metabolismo do animal. Isso explicaria porque os

animais separados por longo período ou expostos a temperaturas muito baixas não são prontamente cuidados pela mãe. As vocalizações parecem ser um parâmetro muito importante da resposta do neonato, tendo em vista que seu repertório de respostas é muito limitado. O trabalho de Lee e Williams (1974) avaliou um índice de cuidado materno, o número de lambidas da mãe sobre a prole, após a manipulação. Demonstraram que ninhadas manipuladas e ninhadas de mães manipuladas receberam mais lambidas entre 5 e 9 dias de vida. Foi observada, porém, queda no número de lambidas após 9 dias de vida. Estes trabalhos (Bell et al., 1971; Lee e Williams, 1974) apontam uma forte alteração na relação mãe/filhote como resultado da MN, podendo ser este um dos principais fatores responsável pelas modificações observadas nos neonatos.

As modificações geradas pela MN se mostram persistentes na vida adulta, como uma resposta de medo atenuada a ambientes novos (Levine et al., 1967; Meerlo et al., 1999), alterações no comportamento sexual (Padoim et al., 2001) e menor resposta a estresse (Meaney et al., 1989). Este tipo de modificação provavelmente é mediada por alterações nos sistemas de neurotransmissão. De fato alguns estudos demonstraram alterações bioquímicas permanentes no encéfalo de ratos adultos manipulados no período neonatal como aumento do metabolismo dopaminérgico no hipotálamo (Papaioannou et al., 2002), assim como uma alteração na neurotransmissão da dopamina no núcleo accumbens (Brake et al., 2004). Adicionalmente, outro trabalho demonstrou diminuição do metabolismo de dopamina (DA) no núcleo accumbens (NAcc) em ratos manipulados no período neonatal (Silveira et al., 2010). O protocolo de intervenção neonatal também demonstrou alterações sobre o comportamento alimentar, nos animais adultos. Animais manipulados no período neonatal ingerem mais alimento palatável comparados a animais controle quando expostos a este em aparato de teste (Silveira et al., 2004, 2008; Benetti et al., 2007) ou caixa-moradia (Silveira et al., 2006), sem apresentar diferença no consumo de ração padrão. Em tarefa de comportamento alimentar, animais machos manipulados apresentaram menor consumo de alimento doce na fase pré-púbere, em comparação com grupo controle. Porém, na fase adulta o efeito da MN foi inverso, apresentando maior consumo em comparação com os animais controle (Silveira et al., 2006). O fato de que o consumo de doce é afetado, mas não o consumo de ração padrão, pode sugerir uma alteração em sistemas relacionados a mecanismos de recompensa nesses animais.

Mecanismos de Recompensa

Os seres vivos são máquinas de sobrevivência. Para tal requerem uma manutenção constante de sua homeostase, um equilíbrio dinâmico sujeito a influências do meio externo e das modificações resultantes do próprio metabolismo. Nos animais existem diversas ações, dentro de um repertório particular de cada espécie, para regulação da homeostase, como buscar sombra em um dia muito ensolarado ou mesmo buscar

alimentos quando necessário. Esses são chamados comportamentos motivados, pois tem por finalidade corrigir uma perturbação homeostática. Estes comportamentos são altamente adaptativos e estão sujeitos a mecanismos de reforço, que facilitam a nova busca por este reforçador.

Muitos destes comportamentos envolvem outros elementos que não somente a pura regulação homeostática, o que nós humanos chamamos de prazer, que nada mais é que a recompensa pelo comportamento realizado. Assim, esses comportamentos adaptativos possuem um caráter *hedônico*. Trazendo para nossa experiência pessoal, nunca lembramos onde comemos comidas insossas, mas refeições deliciosas são muito marcantes e tentamos repeti-las. Mas por que isso ocorre? Aí que entram os mecanismos de recompensa, que são circuitos encefálicos que respondem à interação com reforçadores.

O trabalho de James Olds e Peter Milner (1954) iniciou a elucidação destes circuitos envolvidos na resposta de recompensa. Durante a década de 1950 os pesquisadores realizaram diversos experimentos de auto-estimulação em ratos, onde os animais pressionavam uma alavanca para receber um estímulo elétrico no encéfalo, sendo inclusive observados animais que pressionavam a alavanca até a exaustão se o estímulo não fosse cessado. Este trabalho demonstrou que existiam regiões encefálicas que quando auto-estimuladas pelos animais geravam um reforço muito forte. Porém, estímulos em outras regiões não geravam a mesma resposta. Portanto, existem regiões e estruturas específicas envolvidas nas respostas de recompensa.

Posteriormente, estudos com manipulação farmacológica permitiram determinar as estruturas envolvidas nesse sistema. (Carlezon e Wise, 1996; Carr e White, 1983; Phillips e Fibiger, 1978). Atualmente, o sistema de recompensa é caracterizado por estriado (componente dos núcleos da base), córtex pré-frontal, pálido ventral, mesencéfalo (neurônios dopaminérgicos da substância nigra pars compacta, área tegmentar ventral e grupos de células retrorubrais), amígdala, tálamo, hipocampo e algumas outras estruturas de menor participação. Apesar de diversas estruturas e regiões constituírem esta circuitaria, as estruturas centrais parecem ser os neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral (ATV) que se projetam ao NAcc (Haber e Knutson, 2010).

A DA demonstrou um papel essencial intermediando a busca e o aprendizado por recompensa. Diversos modelos animais vertebrados são utilizados em tarefas de recompensa. Mas um fato interessante é o papel deste neurotransmissor ao longo da escala evolutiva (Barron, 2010). Nematódeos, organismos com um dos sistemas nervosos mais simples, possuem mecanorreceptores dopaminérgicos que respondem à presença de alimento (Rivard et al., 2010). A lesão do nervo esofageal, que possui diversos processos dopaminérgicos, em *Aplysia* bloqueia o condicionamento de toque com pincel durante o consumo de algas-marinhas (Lechner et al., 2000). A aplicação de

DA nos neurônios pós-sinápticos é capaz de reverter este efeito. É interessante observar que a DA já está envolvida com comportamentos motivados mesmo em organismos mais simples.

Esta circuitaria evoluiu para responder a recompensas naturais. O consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura gera aumento na sinalização dopaminérgica (Kringelbach, 2012). Podemos pensar que isto é uma resposta adaptativa, pois é importante reforçar a busca por este tipo de alimento, uma vez que este é uma ótima fonte energética. O sexo é outro reforçador natural. Estudo com animais demonstrou aumento de expressão gênica no NAcc após a cópula (Pitchers, 2010). Um fato interessante é que estímulos associados à recompensa também são capazes de gerar liberação de dopamina, evidenciando um papel desta na predição da recompensa.

Uma distinção muito importante na atividade da circuitaria de recompensa consiste do “querer” e do “gostar”. Aparentemente atreladas estas duas expressões caracterizam comportamentos distintos e possuem inclusive uma circuitaria diferente. O “querer” consiste no componente motivacional de incentivo de um determinado estímulo, enquanto que o “gostar” seria a sensação de prazer no contato com a recompensa (Berridge, 2009).

Teste de Reatividade ao Sabor

Os primeiros estudos sobre reatividade ao sabor iniciaram por volta dos anos 70, quando Jacob Steiner publicou fotografias das expressões faciais da reação de recém-nascidos a sabores doce, salgado, amargo e azedo (Steiner, 1973, 1974). Originalmente, os padrões de reatividade ao sabor eram interpretados como reflexo sensorial (Steiner, 1973) ou medida de consumo (Grill e Norgren, 1978 a,b). No entanto, é necessário distinguir as propriedades afetivas e sensoriais de um sabor, por exemplo, uma resposta hedônica reflete o prazer de um sabor doce, não a intensidade da sensação (Berridge, 2000).

Estudos da neurociência afetiva possibilitaram a identificação de diversas estruturas neuroanatômicas envolvidas na mediação do impacto hedônico. Manipulações, por lesões ou técnicas farmacológicas, demonstram os sistemas envolvidos com as respostas afetivas a sabores, e também auxiliam na distinção das diferentes etapas do consumo alimentar. Diversos neurotransmissores têm sido estudados quanto ao seu envolvimento na reatividade a sabores como opióides (Peciña, 1995), GABA (Wise e Dawson, 1974; Kelly et al., 1992), serotonina (Barnfield et al., 1994; Rivera e Eckel, 2005). Além destes a DA parece estar envolvida. A evidência do envolvimento do sistema dopaminérgico nas respostas a sacarose derivam de estudos que demonstram que a aplicação sistêmica de antagonistas dopaminérgicos eliminam o consumo alimentar real ou por *sham-feeding* (Duong e Weingarten, 1993; Geary e Smith, 1985; Hsiao e Smith, 1995; Schneider, 1989; Schneider et al., 1990; Smith e Schneider, 1988).

Por sua vez, procedimentos que aumentam os níveis de DA aumentam a preferência por sacarose (Brennan et al., 2001; Hajnal e Norgren, 2001; Sills e Vaccarino, 1996; Szczyпка, 2001). Experimentos com microdiálise demonstram que a administração intraoral de sacarose gera um aumento dos níveis extracelulares de DA no NAcc (Hajnal, 2004). Adicionalmente, a DA no NAcc parece interferir na busca ou modular o incentivo percebido da recompensa (Wyvell e Berridge, 2000). Respostas a alimentos palatáveis aumentam o disparo de neurônios dopaminérgicos, especialmente quando a recompensa não é esperada (Schultz, 2006; Ahn e Phillips, 1999). Respostas a drogas também envolvem ativação dopaminérgica (Everitt e Robbins, 2005; Koob e Moal, 2006). Porém, alguns pesquisadores questionam o envolvimento da DA nas respostas hedônicas (Berridge, 1989).

Dentro dessa linha de pesquisa foi criado um teste muito completo para análise do sistema hedônico, o teste de reatividade ao sabor (TRS). A primeira etapa de análise deste teste consiste do estudo individual dos diferentes parâmetros comportamentais, sendo divididos em respostas hedônicas (protrusão lateral da língua, protrusão rítmica da língua, lambida das patas) e aversivas (abertura da boca, esfregar o focinho, lavar a face, agitação dos membros dianteiros). Uma vez realizada esta etapa o agrupamento dos dados nas categorias afetivas pode ser efetuado (Berridge, 2000). Nesse teste se observa que com o aumento progressivo da concentração de sacarose há um aumento paralelo das respostas hedônicas, assim como diminuição das respostas aversivas (Berridge, 2000, Rideout, 1996). Assim sendo, é importante comparar os dados das diferentes categorias afetivas, mesmo em um trabalho que avalie exclusivamente o sabor doce. Os comportamentos hedônicos e aversivos são essencialmente atribuições distintas (Berridge & Grill, 1983, 1984), e cada uma pode ser afetada de forma diferente por mudanças na composição do sabor (Grill & Norgren, 1978a), estado fisiológico do animal (Berridge, Flynn, Schulkin & Grill, 1984; Grill & Norgren, 1978b), ou por manipulação farmacológica (Berridge & Treit, 1986), neurológica (Grill & Norgren, 1978b) e associativa (Grill & Norgren, 1978b). Uma vantagem deste teste na avaliação do valor hedônico é que a administração intra-oral possui a garantia de que o animal receba um estímulo de máxima magnitude, de forma a possibilitar a análise da normalidade da resposta (Berridge, 2000), o que não necessariamente ocorreria em uma exposição *ad libitum*.

Este modelo apresenta forte potencial de integração da pesquisa pré-clínica e clínica. Uma série de estudos comparativos avaliando as respostas afetivas orofaciais em 12 espécies de primatas (incluindo humanos, grandes macacos, macacos do velho mundo e macacos do novo mundo) possibilitou a análise dos microcomponentes do comportamento, demonstrando grande similaridade dos humanos com os grandes macacos (Steiner et al., 2001). Em 1978, Grill e Norgren publicaram um estudo dos microcomponentes das respostas afetivas a sabores em ratos, possibilitando o estabelecimento de uma relação evolutiva com as observações em primatas (Grill e

Norgren, 1978). É claro que esse paralelo nas respostas comportamentais respeita a proporção alométrica das diferentes espécies. Alguns componentes do comportamento ocorrem em alta frequência, e.g. um rato pode emitir centenas de protrusões rítmicas da língua por minuto (Berridge, 2000).

O modelo pré-clínico para avaliação dos sistemas de impacto hedônico apresenta características positivas adicionais. Ratos e camundongos são incapazes de vomitar, portanto, a escolha do que comer é especialmente importante para roedores (Rozin, 1968). Foi sugerido que os roedores adaptaram-se a ausência de reflexo de vômito por meio de um comportamento de neofobia alimentar, extrema cautela para com alimentos novos (Barnett, 1956; Rzoska, 1953). Portanto, fica clara a importância adaptativa do paladar para os roedores, o que indica que suas respostas afetivas hedônicas e aversivas devem ser muito eficientes e confiáveis para análise do pesquisador. Estudos mostram que animais que sofreram MN apresentam menor neofobia (Levine et al., 1967; Meerlo et al., 1999). Adicionalmente, o trabalho de Silveira e colaboradores (2010) observou menor resposta hedônica de ratos manipulados à solução de sacarose. Porém, este trabalho foi realizado com animais machos.

Influência Hormonal em Fêmeas

As fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout (1769) (a espécie utilizada em pesquisas pré-clínicas) iniciam seu ciclo estral (CE) após a puberdade, por volta dos 38-41 dias de vida. Este ciclo consiste de uma flutuação hormonal com duração média de 4 a 5 dias, levando à preparação do órgão reprodutor feminino para a ovulação e, posteriormente, para a cópula. O estradiol encontra-se em níveis baixos na primeira fase do ciclo, o metaestro, aumentando gradualmente durante o diestro, podendo persistir até o terceiro dia do diestro. O estradiol induz a expressão de genes necessários a iniciação do comportamento sexual, incluindo a indução de receptores de progesterona (McCarthy e Becker, 2002). Na fase seguinte, o proestro, há um aumento repentino dos níveis de estradiol, próximo às 12h, desencadeando a ovulação. Esta onda de estradiol é seguida por uma liberação de progesterona, o que induz o estro comportamental, 4 a 6h depois. A progesterona age sinergicamente ao estradiol induzindo o comportamento sexual e é responsável, subsequentemente, pelo término da receptividade sexual (McCarthy e Becker, 2002). Na imagem podemos observar uma representação gráfica desta flutuação hormonal (figura 1).

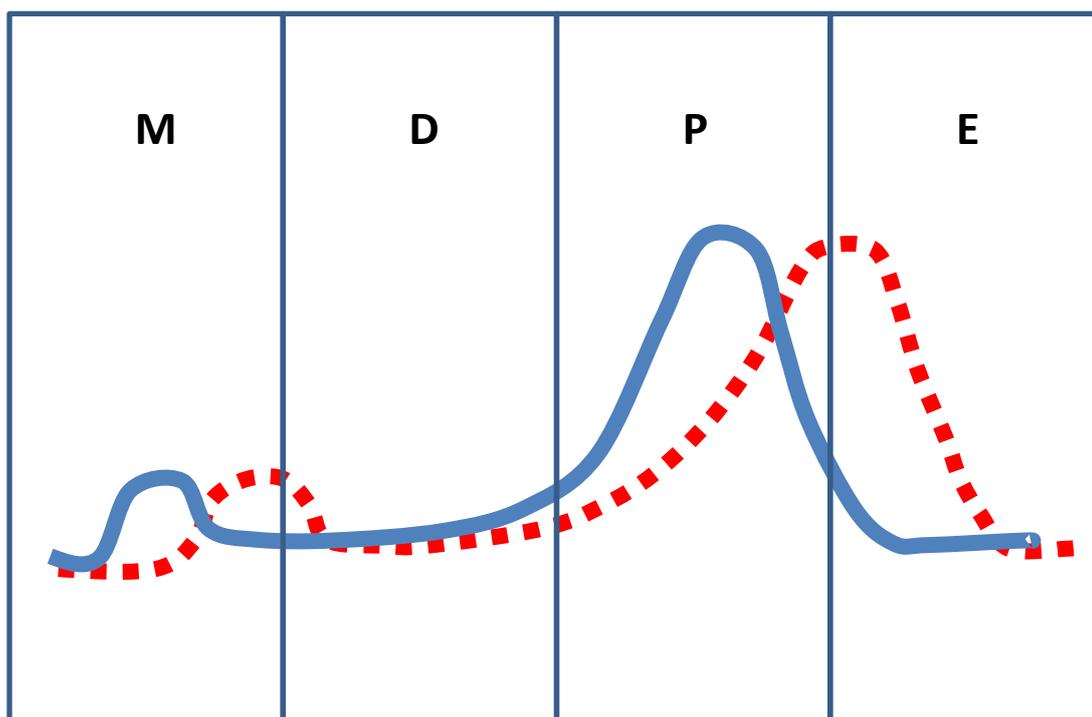


Figura 1: Representação da flutuação hormonal do ciclo estral de ratos fêmeas. M – metaestro; D – diestro; P – proestro; E – estro. Linha contínua=estradiol; linha pontilhada=progesterona. Baseado em Lebron-Milad e Milad (2012).

Um trabalho com ratas, testadas em proestro e diestro, demonstrou maior resposta ingestiva no TRS, enquanto que os animais testados em estro e metaestro (presumivelmente com baixos níveis de estradiol) apresentaram respostas semelhantes a machos no mesmo teste (Clarke e Ossenkopp, 1998). Estudos anatômicos localizaram estradiol em áreas do sistema nervoso central envolvidas com comportamento alimentar e preferência por sabor, incluindo o hipotálamo ventromedial (Gesell e Fisher, 1968) e a amígdala medial (Kemble e Schwartzbaum, 1969). O estradiol influencia diversas regiões do encéfalo, modulando sua fisiologia e funções celulares, assim como a morfologia neuronal. Foi demonstrada uma diminuição da densidade dos espinhos dendríticos no centro do NAcc, por influência de administração de estradiol *in vivo*, também evidenciando substituição de espinhos dendríticos maduros por espinhos menos maduros no centro e cápsula do NAcc (Staffend et al., 2011).

Estudos comportamentais de responsividade a sabores, em ratos, revelaram diferença sexual na preferência ao sabor, assim como flutuações na preferência e acuidade, relacionadas com as alterações naturais dos níveis hormonais que ocorrem durante o ciclo estral e gravidez (Beatty, 1992; Flynn et al., 1993). Essas observações sugerem que hormônios gonadais, como o estradiol, podem modular a responsividade ao sabor em ratos, via mecanismos organizacionais e ativacionais. Ratas fêmeas demonstraram

flutuações na frequência e quantidade das refeições, que variaram com as diferentes fases do ciclo estral (Laviano et al., 1996). Hormônios gonadais, especialmente o estradiol, parecem ser responsáveis por diferenças sexuais no comportamento alimentar em ratos. Por exemplo, a administração central ou periférica de estradiol reduz a ingestão de alimento (Beatty et al., 1975; Stevens, 1989); no entanto, o estradiol também pode apresentar efeitos de aumento do consumo de alimento doce (Gamero et al., 2003). Adicionalmente, a ovariectomia resulta em aumento do consumo alimentar, o que é revertido pela administração de estradiol. Durante o ciclo estral o consumo alimentar é aumentado quando o estradiol apresenta níveis baixos (e.g. metaestro) e reduzido quando o estradiol apresenta níveis altos (e.g. proestro) (Fantino e Brinnel, 1986; Ter Haar, 1972). Prescott (1966) observou que ratas têm um maior nível de auto-estimulação elétrica durante o estro, comparado com outras fases do CE, assim como maior atividade locomotora.

Investigações comportamentais revelaram diferenças sexuais na preferência ao sabor e acuidade por “doce”, “salgado” e “amargo”, o que está correlacionado com mudanças nos níveis hormonais durante o ciclo estral em ratas (Gandelman, 1983). Obviamente, a caracterização desses sabores é baseada na percepção humana. Está bem estabelecido que fêmeas apresentam uma diminuição de 20-40% no consumo alimentar durante o estro, comparado com diestro e proestro (Blaustein e Wade, 1976; Drewett, 1974; Eckel, 1999, 2000, 2004). Um fator conflitante em pesquisas sobre consumo alimentar é que apesar de as mulheres serem mais sensíveis a transtornos no comportamento alimentar do que homens (Kornstein, 2002; Oliver e Wardle, 1998), a grande maioria dos estudos com modelos animais são realizados em machos (Kelly et al., 1999; Harris et al., 2002).

Objetivos

Objetivo Geral

Verificar a influência da manipulação neonatal em ratas fêmeas sobre reatividade ao sabor doce em distintas fases do desenvolvimento (pré-púberes e adultas) e sua variação em função das diferentes fases do ciclo estral (adultas), correlacionando tais dados com medidas bioquímicas de proteínas relacionadas ao sistema dopaminérgico no NAcc.

Objetivos Específicos

Análises Comportamentais

- a) Verificar o efeito da manipulação no período neonatal em ratas fêmeas antes da puberdade (iniciando aos 28 dias) sobre a reatividade ao sabor doce usando soluções de sacarose 0,03M; 0,1M; 0,3M e 1M.
- b) Verificar o efeito da manipulação neonatal em ratas fêmeas na idade adulta (a partir dos 60 dias) sobre a reatividade ao sabor doce usando soluções de sacarose 0,1M e 0,3M em diferentes fases do ciclo estral;

Análises Bioquímicas

- a) Verificar o efeito da manipulação no período neonatal sobre o imunocontéudo de Tirosina Hidroxilase (enzima-chave na biossíntese da dopamina) e receptor D2 para dopamina no NAcc de ratas fêmeas juvenis e adultas.

Materiais e Métodos

Animais

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (Nº23280) e seguiu as recomendações do International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), e da Federação de Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental. Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento animal, assim como reduzir o número de animais utilizados.

37 ratas prenhes criadas em nosso próprio biotério foram aleatoriamente selecionadas. Elas foram mantidas sozinhas nos últimos dias de gestação em caixas-moradia de Plexiglas (65x25x15cm), com assoalho coberto por maravalha e mantidas em ambiente controlado: fonte luminosa ligada das 7:00 até 19:00 h, temperatura de 22 + 2°C, troca de maravalha duas vezes semanais, comida e água provida ad libitum. O dia de nascimento foi considerado dia 0. Todas ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes e mantidas intactas até o dia do desmame, a não ser para o protocolo de manipulação neonatal que foi realizado entre 10:00 e 15:00 h. Os pesquisadores trocavam de luvas entre os procedimentos de manipulação de cada ninhada, evitando que o odor das ninhadas se espalhasse de ninho para ninho. As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no 21º dia pós-natal. Não mais de 2 animais por ninhada foram utilizados nas tarefas comportamentais e somente 1 animal/ninhada para os procedimentos bioquímicos. Somente fêmeas foram utilizadas neste trabalho.

Manipulação Neonatal

As ratas Wistar prenhes foram aleatoriamente divididas em dois grupos.

Não-manipulado (C): As ninhadas foram mantidas intactas, na presença de suas mães, do dia do nascimento até o desmame. Os técnicos do biotério foram instruídos a não manusear os animais, nem mesmo para limpeza das caixas-moradia. O próprio pesquisador ficou responsável pela limpeza. A maravalha suja era cuidadosamente removida no entorno do ninho, evitando perturbar os filhotes e a mãe, e substituída por maravalha limpa.

Manipulado (M): A rata mãe era gentilmente puxada para o lado da caixa oposto ao ninho, os filhotes então eram removidos e colocados em um recipiente limpo com duas folhas de papel toalha. Esse recipiente era colocado em uma incubadora, sendo mantida à temperatura de 30-32°C (figura 2). Após 10 min, os animais retornavam aos cuidados de suas mães. Este procedimento durou dos dias 1 a 10 seguintes ao nascimento. Após este período os animais foram mantidos sem distúrbios até o 21º dia de vida (desmame). Os técnicos do biotério foram instruídos a não manusear os animais, nem mesmo para limpeza das caixas-moradia. O mesmo procedimento de limpeza do grupo C foi utilizado para estes animais.



Figura 2: Ilustração do procedimento de manipulação neonatal.

Teste de Reatividade ao Sabor

O teste de reatividade ao sabor foi realizado em duas idades, iniciando aos 28 dias de vida ou na idade adulta, aos 60 dias. Cada animal só foi testado em uma idade. No 1º dia os animais foram colocados sobre um espelho (30cmx25cm) por 1 min, para fins de habituação. Durante os cinco dias seguintes, um volume de 100µl de água era administrada na boca do animal, utilizando-se uma pipeta com ponteira plástica. Após esses 6 dias de habituação, a sessão de teste foi realizada: foram administradas soluções de sacarose, com intervalos de 30 min entre administrações. As expressões faciais foram registradas com câmera digital durante 1 min para posterior análise. Foram analisadas as expressões faciais hedônicas positivas (protrusão de língua rítmicas e laterais) e as expressões faciais aversivas (abertura da boca, esfregar o focinho, lavar a face, agitação dos membros dianteiros). Os comportamentos foram analisados quadro a quadro no software KM Player®, por experimentador cego ao tratamento de manipulação neonatal, e expressos em número de quadros totais e frequência de protrusões (1 quadro = 1/30s). Adaptado de Berridge (2000).

No primeiro experimento, animais de 28 dias (PND 28) dos grupos C e M foram testados para duas concentrações de sacarose (0,1M e 0,3M de Sacarose), seguindo o protocolo descrito acima. Em um experimento subsequente, utilizando outros animais aos 28 dias de vida (PND 28) dos grupos C e M, foi realizado um novo teste para duas concentrações adicionais de sacarose (0,03M e 1M de Sacarose), seguindo o protocolo descrito acima.

Em outros animais C e M das mesmas ninhadas, o ciclo estral foi acompanhado diariamente a partir dos 60 dias (PND 60), e somente animais com 2 ciclos regulares foram utilizados. Os animais foram submetidos aos procedimentos de habituação descritos acima e testados para duas concentrações de sacarose (0,1M e 0,3M de Sacarose). Nesse experimento foram realizados 4 dias de teste, após a habituação. Anteriormente a cada dia de teste, a fase do ciclo estral foi avaliada. A proposta foi avaliar as respostas de cada animal em diferentes fases do ciclo estral.

Avaliação do Ciclo Estral

Os animais eram retirados da caixa-moradia, e gentilmente manuseados para que ficassem calmos, de forma a evitar que estes se machucassem durante o procedimento. Então, uma pipeta Pasteur, contendo 100 µl de solução fisiológica (0,9%), era gentilmente introduzida na entrada da vagina do animal. A solução era dispensada dentro do canal vaginal, e recuperada por diferença de pressão na pipeta. A amostra era colocada em lâmina de vidro e imediatamente analisada em microscópio óptico, para determinação da fase do ciclo estral. Este procedimento foi realizado durante dois ciclos completos das fêmeas. Somente animais com ciclos regulares foram utilizados.

Obtenção das amostras para os ensaios bioquímicos

Após os testes comportamentais, os animais foram mortos por guilhotinamento, seguindo normas determinadas pelo comitê de ética da nossa Universidade. O encéfalo foi coletado e o NAcc dissecado para posterior análise bioquímica. Todas as amostras foram armazenadas a -70°C até o dia do uso.

Western Blotting

- Tirosina Hidroxilase

Para os estudos de *immunoblotting* as amostras (n=4-5/grupo) foram preparadas por homogeneização em tampão de lise contendo Hepes 10 mM, KCl 2,5 M, EDTA 0,6 mM (pH 7,9), PIC (coquetel de inibidores de proteases) 1%, e dodecil sulfato de sódio 1% (SDS). Alíquotas foram retiradas de acordo com a determinação da concentração de proteína, e β-mercaptoetanol foi adicionado a uma concentração final de 5%. Amostras contendo 50 µg de proteína foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Depois da eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas a uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 2h com leite em pó 5% em Tampão Tris-Salino (TBS) mais Tween-20 1%, seguido de incubação overnight a 4°C com anti- Tirosina Hidroxilase (diluição 1:2000, anticorpo policlonal de coelho, Millipore®) diluído em solução T-TBS (TBS mais Tween-20 1%). Subsequentemente, as membranas foram incubadas por 2h com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anticorpo anti-imunoglobulina de coelho) diluído em T-TBS. As membranas

foram reincubadas com anticorpo contra β -actina (diluição 1:1000, anticorpo monoclonal de galinha, Sigma-Aldrich®) como um controle interno. Bandas imunorreativas foram reveladas por um Kit amplificador de quimioluminescência (ECL Amersham da GE Healthcare®), e detectados utilizando filme de raio-X. Os filmes de *immunoblot* foram escaneados e a imagem digital analisada com software Optiquant (Packard Instrument®).

- Receptor D2

As amostras (n=4-5/grupo) foram preparadas por homogeneização em tampão de lise contendo Hepes 10 mM, KCl 2,5 M, EDTA 0,6 mM (pH 7,9), PIC 1%, e dodecil sulfato de sódio 1% (SDS). Alíquotas foram retiradas de acordo com determinação da concentração de proteína, e β -mercaptoetanol foi adicionado a uma concentração final de 5%. Amostras contendo 50 μ g de proteína foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Depois da eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas a uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 2h com leite em pó 5% em Tampão Tris-Salino (TBS) mais Tween-20 1%, seguido de incubação overnight a 4°C com anti- Receptor D2 (diluição 1:1500, anticorpo policlonal de coelho, Millipore®) diluído em solução T-TBS (TBS mais Tween-20 1%). Subsequentemente, as membranas foram incubadas por 2h com anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído em T-TBS. As membranas foram reincubadas com anticorpo contra β -actina (diluição 1:1000, anticorpo monoclonal de galinha, Sigma-Aldrich®) como um controle interno. Bandas imunorreativas foram reveladas por um Kit amplificador de quimioluminescência (ECL Amersham da GE Healthcare®), e detectados utilizando filme de raio-X. Os filmes de *immunoblot* foram escaneados e a imagem digital analisada com software Optiquant (Packard Instrument®).

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, e foram analisados por Teste t de Student e Anova de Medidas Repetidas, conforme o caso. O nível de significância foi tido como diferente quando o valor de P era igual ou menor que 0,05. O tamanho amostral adequado foi baseado em outros artigos publicados envolvendo os procedimentos utilizados neste trabalho (Silveira et al, 2010, Bowyer et al., 1998; Crema et al., 2010).

Resultados

Teste de Reatividade ao Sabor

Nos animais jovens (31-32 dias) foi observada uma maior frequência de protrusões de língua do grupo M (Fig. 3) em resposta à sacarose. Na concentração de 0,1M de sacarose, a média \pm erro padrão da média para o grupo C foi de $35 \pm 6,3$ e para o grupo M foi de $52,13 \pm 4,6$, obtendo um valor de $P= 0,048$ ($t(15)=1,96$). Nos testes com a solução de sacarose 0,3M não houve diferença estatística significativa, $t(15)= 2$, $P=0,064$. A avaliação do número de quadros totais do comportamento de protrusão de língua (Fig. 4) não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos, tanto para a solução de sacarose 0,1M (Teste t , $t(15)= 1,96$, $P=0,069$) quanto para a solução de sacarose 0,3M (Teste t , $t(15)=1,77$, $P=0,1$). Praticamente nenhum comportamento aversivo foi exibido, portanto estes dados não estão apresentados.

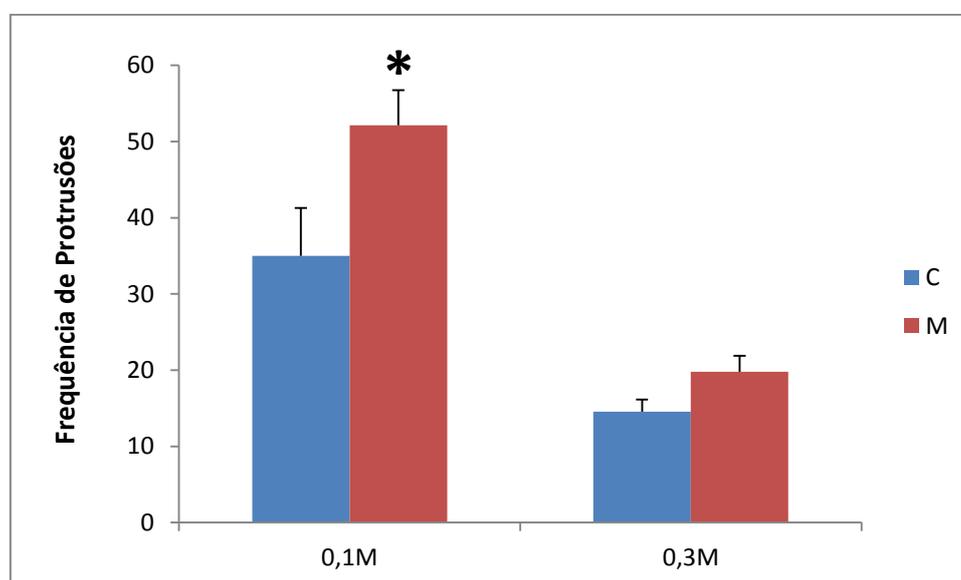


Figura 3: Frequência de protrusões de língua no TRS em diferentes concentrações em ratos jovens – solução de sacarose 0,1M [Teste t , $t(15)=1,96$, $P=0,048$, média \pm E.P.M., $C=35 \pm 6,3$ e $M=52,13 \pm 4,6$]; sacarose 0,3M [Teste t , $t(15)= 2$, $P=0,064$].

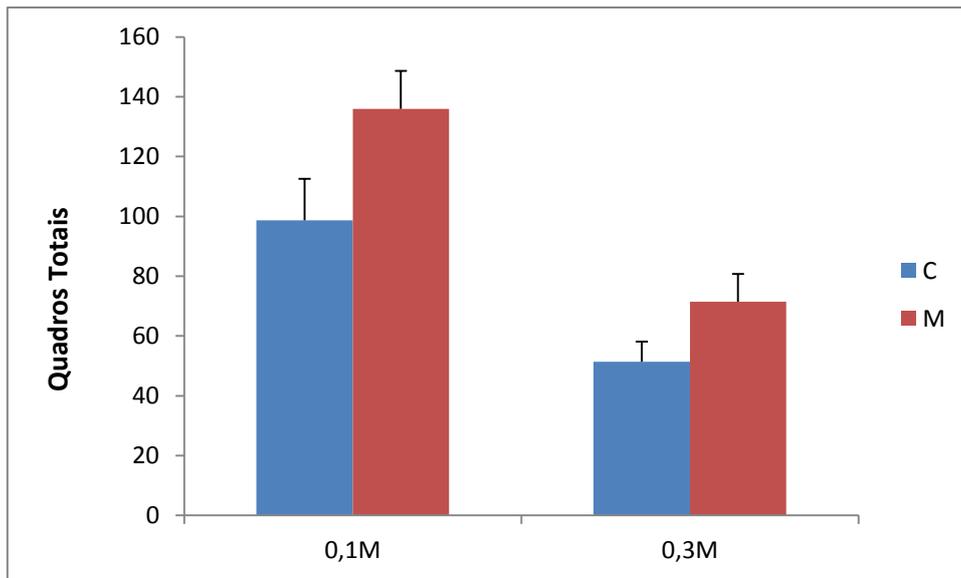


Figura 4: Número de quadros totais de protrusões de língua no TRS em diferentes concentrações em ratas jovens – solução de sacarose 0,1M [Teste t , $t(15)= 1,96$, $P=0,069$]; sacarose 0,3M [Teste t , $t(15)=1,77$, $P=0,1$].

A fim de obtermos uma maior abrangência das concentrações de sacarose, esse teste foi feito com novos animais em outras concentrações. No segundo teste com animais jovens (31-32 dias) também foi observada uma maior frequência de protrusões de língua do grupo M (Fig. 5) em resposta à sacarose. Na concentração de 1M de sacarose, a média \pm erro padrão da média para o grupo C foi de $36 \pm 1,8$ e para o grupo M foi de $50,11 \pm 6,28$, obtendo um valor de $P= 0,046$ ($t(16)=2,16$). Nos testes com a solução de sacarose 0,03M não houve diferença estatística significativa, $t(16)=0,31$, $P=0,76$. A avaliação do número de quadros totais do comportamento de protrusão de língua (Fig. 6) não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos para a solução de sacarose 0,03M (Teste t , $t(16)= 0,46$, $P=0,65$). Porém, foi encontrada diferença estatisticamente significativa para a solução de sacarose 1M, sendo a média \pm erro padrão da média para o grupo C igual $87,8 \pm 5,4$ e para o grupo M igual a $133,3 \pm 17,9$, obtendo um valor de $P= 0,027$. Praticamente nenhum comportamento aversivo foi exibido, portanto estes dados não estão apresentados.

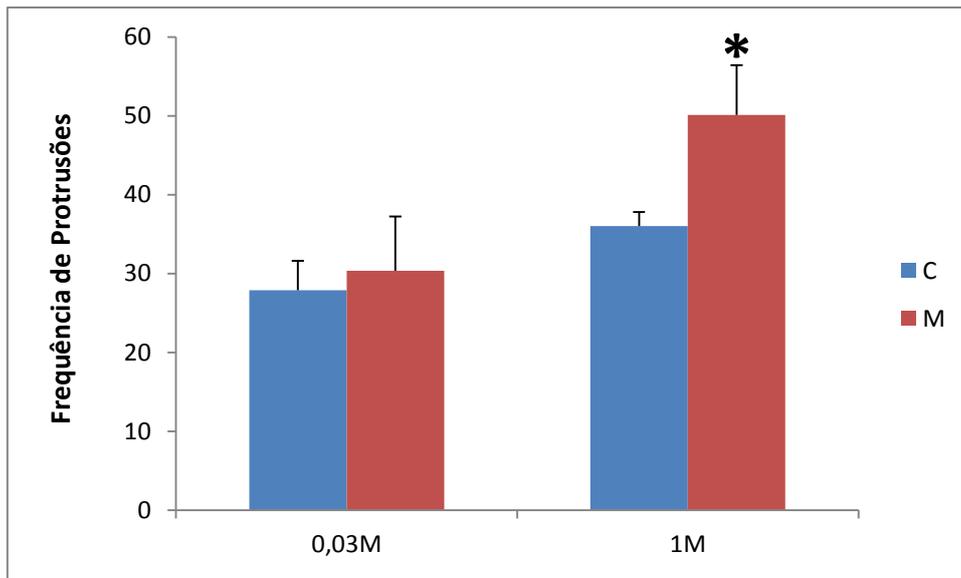


Figura 5: Frequência de protrusões de língua no TRS em diferentes concentrações em ratas jovens – solução de sacarose 0,03M [Teste *t*, $t(16)=0,31$, $P=0,76$] ; sacarose 1M [Teste *t*, $t(16)= 2,16$, média±E.P.M., $C=36 \pm 1,8$ e $M=50,11 \pm 6,28$, $P=0,046$].

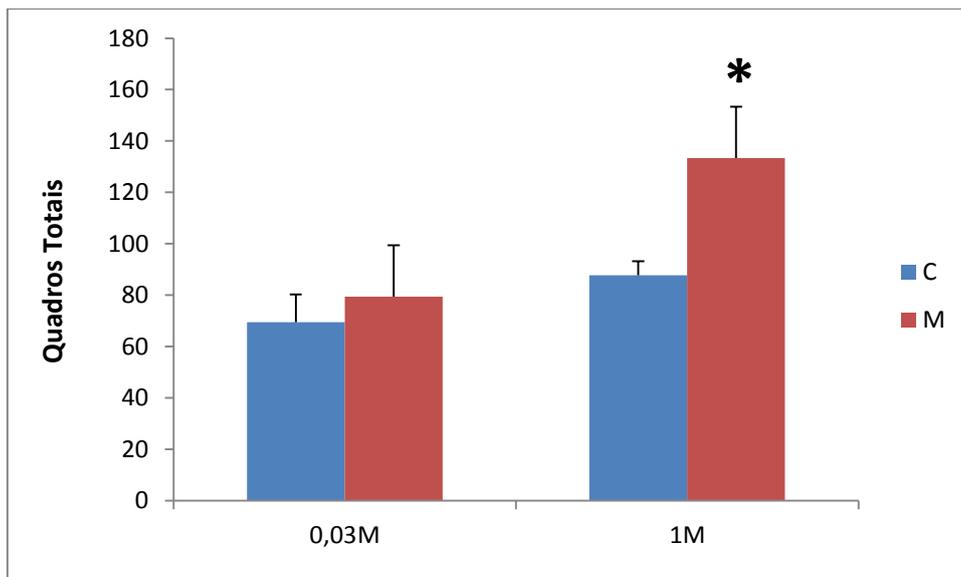


Figura 6: Número de quadros totais de protrusões de língua no TRS em diferentes concentrações em ratas jovens – solução de sacarose 0,03M [Teste *t*, $t(16)= 0,46$, $P=0,65$] ; sacarose 1M [Teste *t*, $t(16)=2,43$, média±E.P.M., $C=87,8 \pm 5,4$ e $M=133,3 \pm 17,9$, $P=0,027$].

Nos animais adultos (>60 dias), para a solução de sacarose 0,1M, uma ANOVA de medidas repetidas utilizando os 4 dias de teste e a manipulação neonatal como fatores, não demonstrou diferença estatística significativa, tanto para frequência de protrusão de língua (Fig. 7: dia do teste, $F(2,17)=1,11$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,044$; $P>0,05$), quanto para número de quadros totais de protrusões (Fig. 8: dia do teste, $F(2,17)=1,5$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,05$; $P>0,05$). Também não

houve diferença estatisticamente significativa para a solução de sacarose 0,3M, tanto para frequência de protrusão de língua (Fig. 9: dia do teste, $F(2,17)=2,81$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,35$; $P>0,05$), quanto para número de quadros totais de protrusões (Fig. 10: dia do teste, $F(2,17)=3,97$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,04$; $P>0,05$). Praticamente nenhum comportamento aversivo foi exibido, portanto estes dados não estão apresentados.

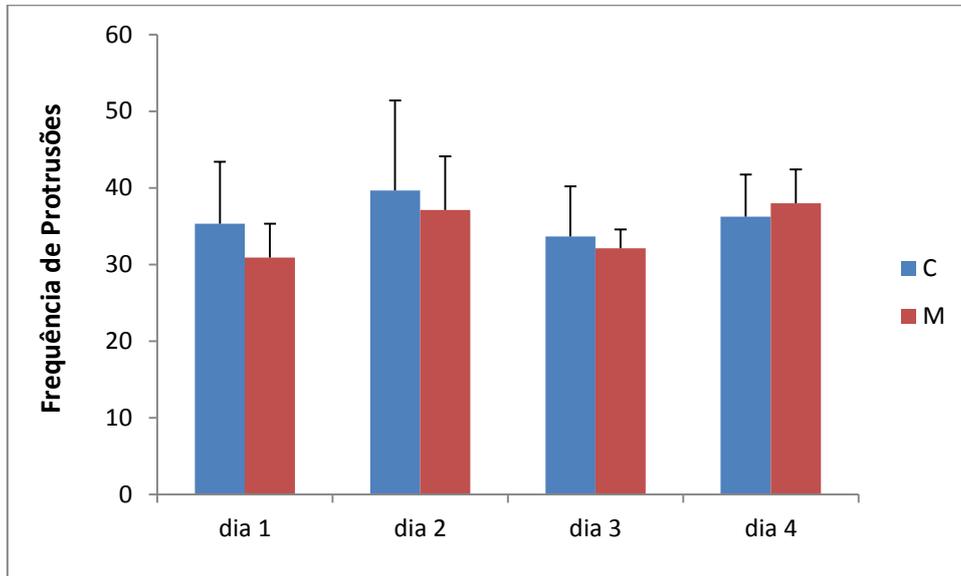


Figura 7: Frequência de protrusões de língua no TRS para solução de sacarose 0,1M em ratas adultas, média \pm EPM [ANOVA de medidas repetidas: dia do teste, $F(2,17)=1,11$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,044$; $P>0,05$].

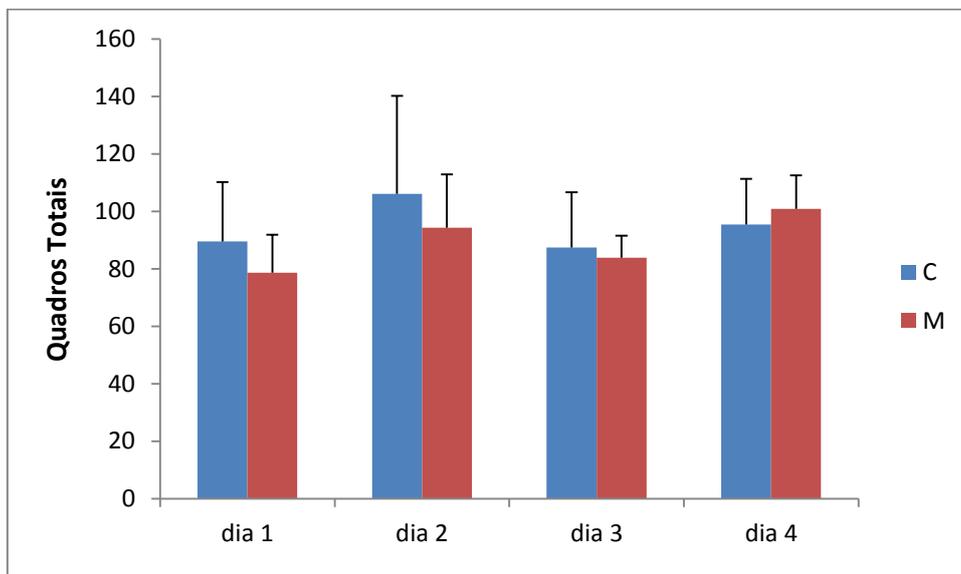


Figura 8: Número de quadros totais de protrusões de língua no TRS para solução de sacarose 0,1M em ratas adultas, média \pm EPM [ANOVA de medidas repetidas: dia do teste, $F(2,17)=1,5$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,05$; $P>0,05$].

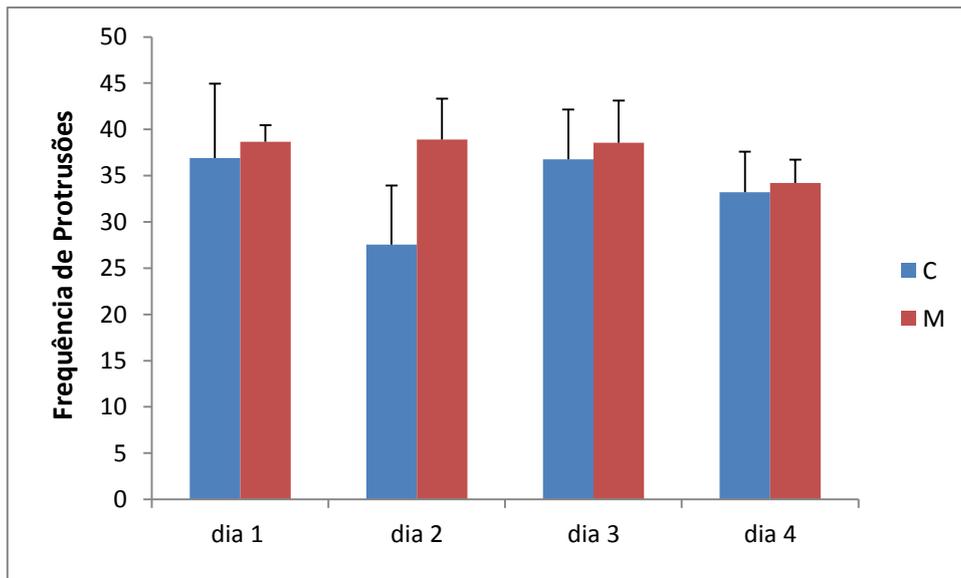


Figura 9: Frequência de protrusões de língua no TRS para solução de sacarose 0,3M em ratas adultas, média \pm EPM [ANOVA de medidas repetidas: dia do teste, $F(2,17)=2,81$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,35$; $P>0,05$].

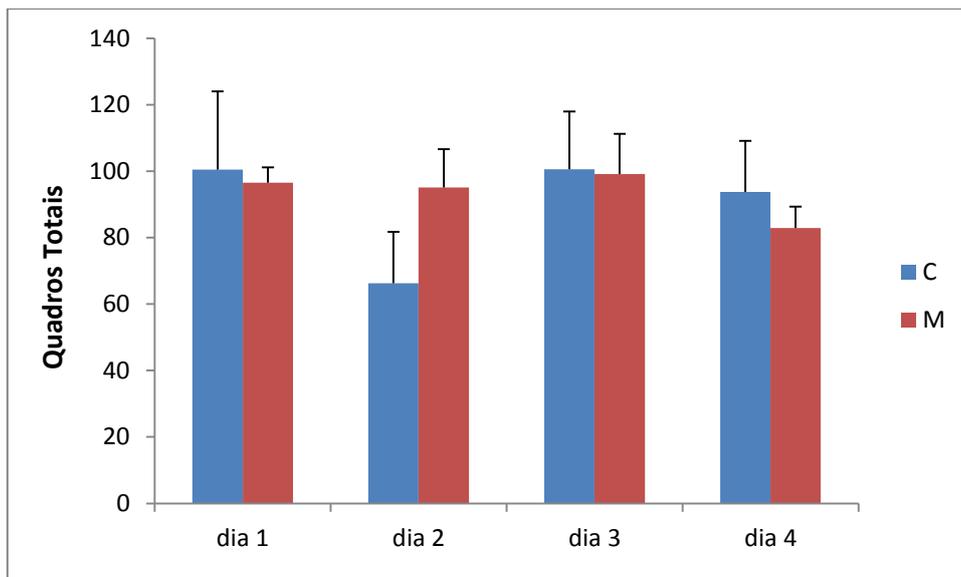


Figura 10: Número de quadros totais de protrusões de língua no TRS para solução de sacarose 0,3M em ratas adultas, média \pm EPM [ANOVA de medidas repetidas: : dia do teste, $F(2,17)=3,97$; manipulação neonatal, $F(2,17)=0,04$; $P>0,05$].

A análise individual de cada fase do ciclo estral os animais adultos não demonstrou diferença estatisticamente significativa para nenhuma análise (vide Tabela 1 para os resultados dos testes estatísticos comparando os dois grupos, manipulado e não-manipulado). As frequências e quadros totais de protrusões de língua para a soluções de sacarose 0,1M e 0,3M para cada fase do ciclo estral (metaestro, diestro, proestro, estro) estão apresentados nas figuras 11, 12, 13 e 14.

	[] sacarose	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro
Frequência	0,1M	t(10)=0,009; P=0,99	t(13)=0,15; P=0,88	t(10)=0,27; P=0,79	t(14)=0,19; P=0,85
Quad Totais	0,1M	t(10)=0,04; P=0,97	t(13)=0,16; P=0,87	t(10)=0,26; P=0,8	t(14)=0,12; P=0,91
Frequência	0,3M	t(9)=0,36; P=0,73	t(13)=0,02; P=0,99	t(10)=0,96; P=0,36	t(14)=0,1; P=0,92
Quad Totais	0,3M	t(9)=0,67; P=0,52	t(13)=0,17; P=0,87	t(10)=0,74; P=0,47	t(14)=0,38; P=0,71

Tabela 1. Resultados das comparações entre os grupos manipulado e não-manipulado nas diferentes fases do ciclo estral (teste t de Student). Frequência = frequência de protrusões de língua; Quad Totais = quadros totais de protrusões de língua; [] sacarose = concentração de sacarose.

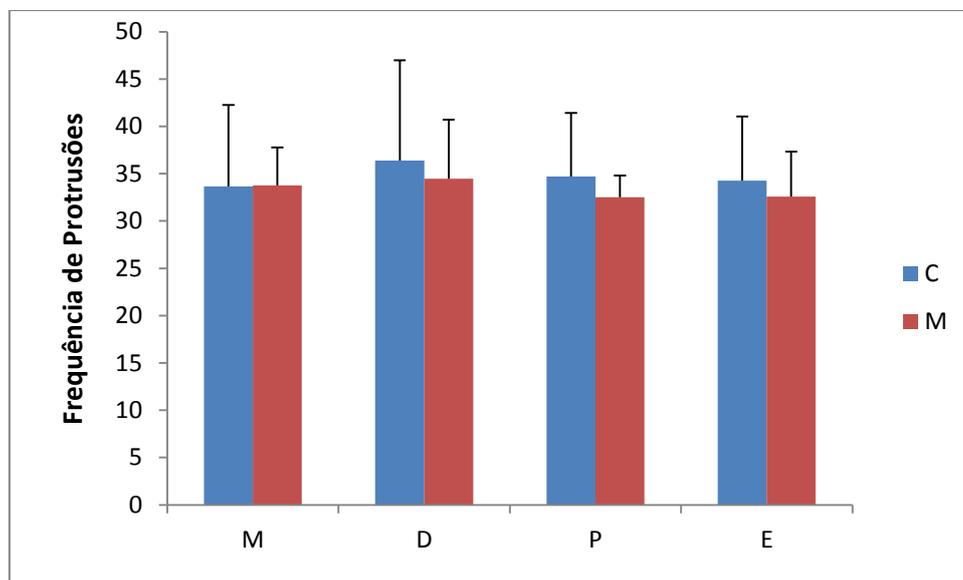


Figura 11: Frequência de protrusões de língua para a solução de sacarose 0,1M, média \pm EPM: metaestro (Teste t, t(10)=0,009; P=0,99), diestro (Teste t, t(13)=0,15; P=0,88), proestro (Teste t, t(10)=0,27; P=0,79) e estro (Teste t, t(14)=0,19; P=0,85).

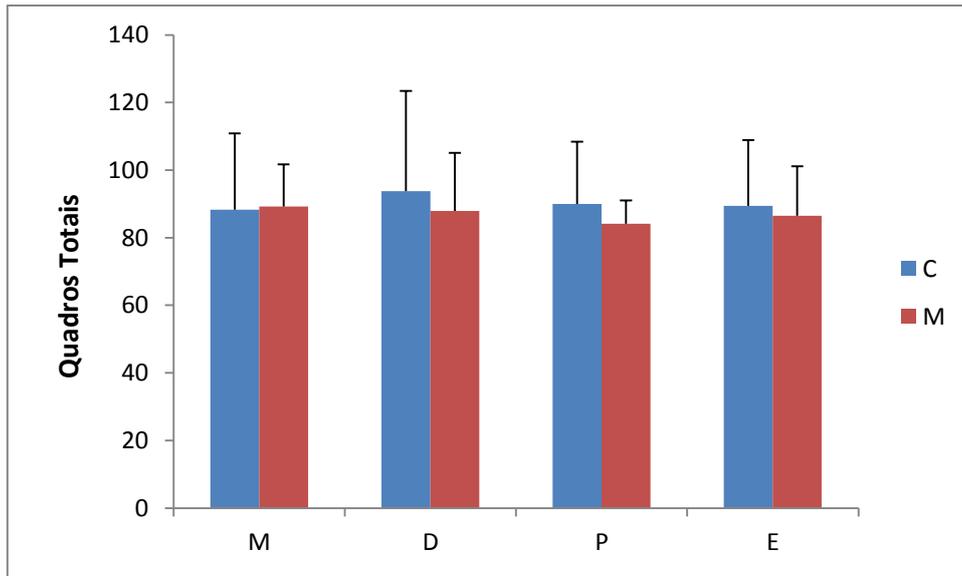


Figura 12: Quadros totais para a solução de sacarose 0,1M, média \pm EPM: metaastro (Teste t , $t(10)=0,04$; $P=0,97$), diestro (Teste t , $t(13)=0,16$; $P=0,87$), proestro (Teste t , $t(10)=0,26$; $P=0,8$) e estro (Teste t , $t(14)=0,12$; $P=0,91$).

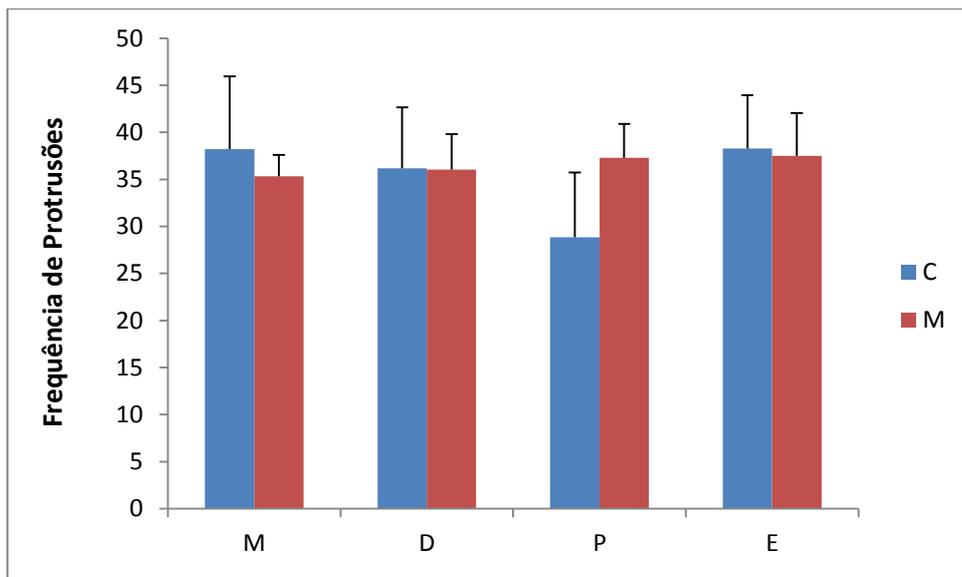


Figura 13: Frequência de protrusões de língua para a solução de sacarose 0,3M, média \pm EPM: metaastro (Teste t , $t(9)=0,36$; $P=0,73$), diestro (Teste t , $t(13)=0,02$; $P=0,99$), proestro (Teste t , $t(10)=0,96$; $P=0,36$) e estro (Teste t , $t(14)=0,1$; $P=0,92$).

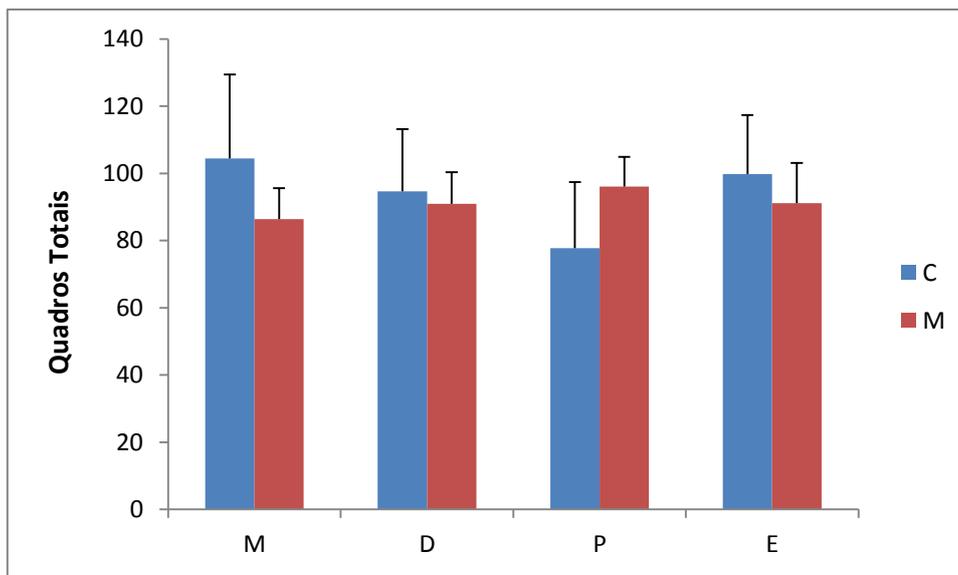


Figura 14: Quadros totais para a solução de sacarose 0,3M, média \pm EPM: metaestro (Teste *t*, $t(9)=0,67$; $P=0,52$), diestro (Teste *t*, $t(13)=0,17$; $P=0,87$), proestro (Teste *t*, $t(10)=0,74$; $P=0,47$) e estro (Teste *t*, $t(14)=0,38$; $P=0,71$).

Western Blot

A análise de imunotransferência de amostras do NAcc de animais jovens (31-32 dias), não revelou diferença significativa na quantificação do imunoconteúdo de receptor D2 (Fig. 15: Teste *t*, $t(6)=0,16$, $P=0,88$) e de tirosina hidroxilase (Fig. 16: Teste *t*, $t(6)=0,83$, $P=0,44$). A análise de imunotransferência de amostras do NAcc de animais adultos (>60 dias) também não revelou diferença significativa na quantificação do imunoconteúdo de receptor D2 (Fig. 17: Teste *t*, $t(6)=0,55$, $P=0,6$) e de tirosina hidroxilase (Fig. 18: Teste *t*, $t(6)=1,46$, $P=0,2$).

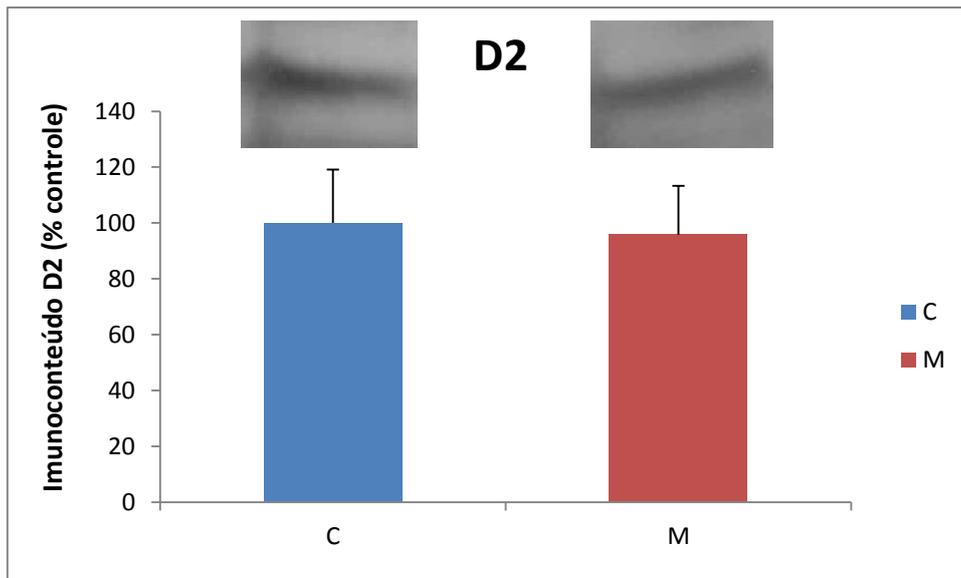


Figura 15: quantificação do imunoconteúdo de receptor D2 no NAcc de animais jovens (Teste t , $t(6)=0,16$, $P=0,88$).

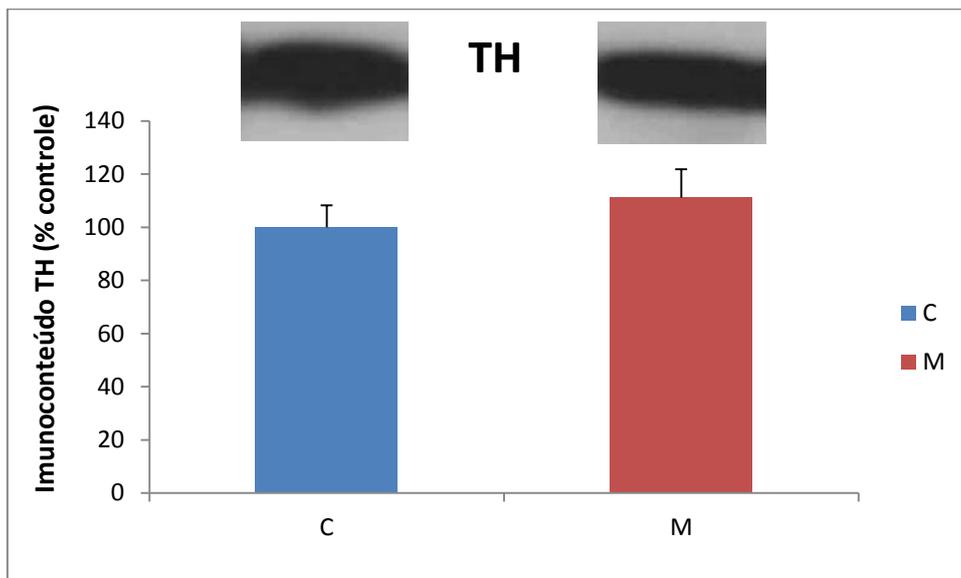


Figura 16: quantificação do imunoconteúdo de tirosina hidroxilase no NAcc de animais jovens (Teste t , $t(6)=0,83$, $P=0,44$).

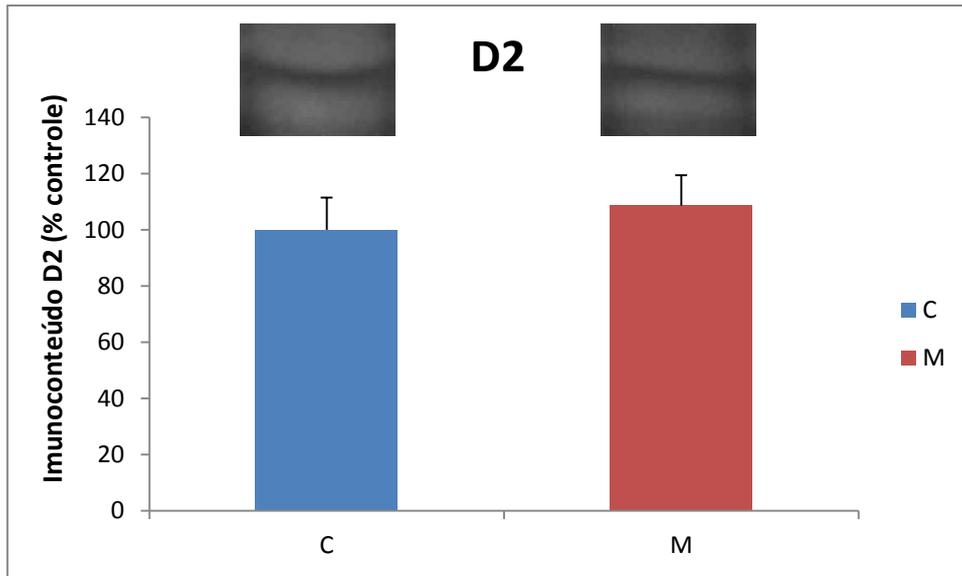


Figura 17: quantificação do imunocnteúdo de receptor D2 no NAcc de animais adultos (Teste t , $t(6)=0,55$, $P=0,6$).

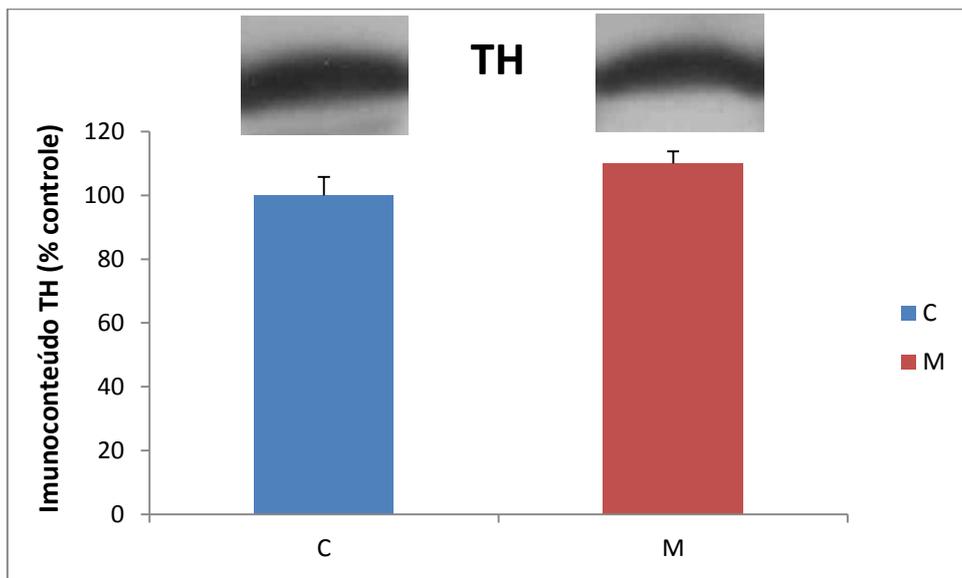


Figura 18: quantificação do imunocnteúdo de tirosina hidroxilase no NAcc de animais adultos (Teste t , $t(6)=1,46$, $P=0,2$).

Discussão

O presente trabalho teve por objetivo estudar a influência da MN sobre a reatividade orofacial ao sabor doce, utilizando um protocolo de teste de reatividade ao sabor. Os resultados encontrados demonstram uma maior reatividade ao sabor doce nos animais manipulados quando testados na fase pré-púbere. Esta resposta é um indicativo de modificações nos mecanismos hedônicos como resultado da MN. Porém, não foi encontrada diferença estatística para a reatividade ao sabor doce entre animais adultos dos grupos controle e manipulado.

No primeiro TRS realizado com animais pré-púberes foi comparada a resposta de animais manipulados e controles (não-manipulados) a duas soluções de sacarose, nas concentrações de 0,1M e 0,3M. A reatividade ao sabor não apresentou um aumento proporcional à concentração de sacarose. Já foi anteriormente observado que a curva de responsividade ao sabor doce não é linear em relação à concentração da molécula que apresenta sabor doce, e em certas circunstâncias, concentrações maiores podem apresentar menor responsividade (ver, por exemplo, Hajnal et al., 2010). Foi observada uma maior frequência de protrusões de língua em jovens manipulados para solução de sacarose 0,1M. No entanto, outro trabalho demonstrou menor consumo de alimento doce em animais manipulados durante a fase pré-púbere (Silveira et al., 2006). Porém, alguns estudos demonstram que as respostas orofaciais afetivas envolvem mecanismos encefálicos distintos do comportamento de consumo alimentar (Berridge, 2000). De forma interessante, se observa uma menor resposta nos dois grupos, controle e manipulado, para a solução de sacarose 0,3M com relação à solução de 0,1M. Um estudo demonstrou que a resposta à solução de sacarose atinge o pico na concentração de 0,3M (Flynn, 1995). Possivelmente a diferença de concentração entre as soluções, 0,1M e 0,3M de sacarose, não foi suficiente para distinção dos animais e estes acabaram por apresentar uma resposta de menor interesse à solução subsequente. Um trabalho com *sham-feeding*, que avalia componentes orossensoriais, encontrou uma resposta mais forte para solução de sacarose 0,3M, comparado a soluções de sacarose 0,03M e 0,1M (Hajnal et al., 2004). Porém, este trabalho foi realizado com animais adultos. Então, para descartar a hipótese de que os animais pré-púberes teriam uma resposta hedônica menor a soluções de alta concentração de sacarose, um segundo TRS foi realizado em animais pré-púberes utilizando-se soluções de sacarose 0,03M e 1M. Neste TRS se observou uma maior frequência e maior número quadros totais de protrusões de língua em jovens manipulados para solução de sacarose 1M, sem diferença estatística para a solução de 0,03M. É importante destacar que neste teste as respostas hedônicas dos dois grupos foram maiores para a solução de sacarose 1M em comparação à solução de 0,03M. Com a maior diferença na concentração das soluções testadas ficou mais clara a maior sensibilidade dos animais manipulados.

Adolescentes são mais propensos a buscar recompensas, tanto em alimentos quanto em drogas de abuso, o que poderia estar associado com o aumento do valor hedônico associado a recompensas. Um estudo demonstrou que ratos pré-púberes (33-34 dias) são mais sensíveis do que adultos a propriedades hedônicas de estímulos apetitivos (Wilmouth e Spear, 2009), foram observadas maior resposta hedônica à sacarose no TRS e maior consumo voluntário de solução de sacarose em animais pré-púberes comparados com animais adultos. Portanto, esses achados sugerem uma tendência natural dos animais jovens possuírem uma maior resposta a estímulos apetitivos, o que estaria exacerbado nos animais manipulados como observado no presente estudo. Além disso, os animais manipulados adultos apresentam menor resposta hedônica à sacarose e maior consumo de alimento doce (Silveira et al., 2010). Porém, os animais manipulados jovens apresentam maior resposta hedônica à sacarose (resultados do presente trabalho) e menor consumo de alimento doce (Silveira et al., 2006). De forma interessante, a MN parece gerar um desequilíbrio na relação respostas hedônicas/consumo de alimento palatável, o que se manifesta de maneiras opostas em idades diferentes. Diversos estudos observam uma forte relação entre consumo alimentar e sensibilidade à recompensa (para revisão: Avena et al., 2013).

Uma questão importante é o fato de que o protocolo do TRS não envolve treino com exposição à sacarose, ou seja, neste teste os animais são expostos pela primeira vez a este sabor. É sabido que existe uma preferência inata por sabores doces, observada de roedores (Diaz-Cenzano e Chotro, 2010) a humanos (Steiner, 1974). Porém, os roedores por não possuírem reflexo de vômito (Rozin, 1968) desenvolveram um comportamento de neofobia alimentar, cautela ao contato com alimentos novos (Barnett, 1956; Rzoska, 1953), o que poderia interferir nos resultados deste teste. No entanto, outros trabalhos demonstram que os animais manipulados no período neonatal apresentam menor neofobia (Levine et al., 1967; Meerlo et al., 1999), o que pode explicar porque estes animais apresentaram uma resposta maior à sacarose comparados aos animais controle. Contudo, observamos nas fêmeas adultas que a repetição do teste utilizando sacarose não modifica os resultados. Desse modo, seria pouco provável que nossos resultados se devessem a uma menor neofobia.

A questão estudada neste trabalho envolve a avaliação da influência da manipulação neonatal sobre o TRS em fêmeas de duas idades distintas, fêmeas pré-púberes e adultas. Desta forma foi possível comparar o período anterior e o período durante a influência hormonal do ciclo estral. Para observação do TRS e sua relação com a flutuação hormonal das quatro fases do ciclo estral uma adaptação do protocolo foi realizada. Baseado no trabalho de Neath e colaboradores (2010), que realizou 5 dias seguidos de exposição à sacarina no TRS em ratos sem encontrar uma resposta de habituação ao sabor, foi utilizado um protocolo com 4 dias de exposição à sacarose nas fêmeas adultas. A proposta desta adaptação do TRS foi poder realizar o teste em diferentes fases do ciclo estral de cada fêmea, de forma a realizar uma análise pareada

dos resultados dos animais. Portanto, a primeira análise realizada nos resultados do TRS nas fêmeas adultas foi uma comparação entre as respostas hedônicas nos 4 dias. Os resultados demonstraram não haver diferença entre a resposta dos animais nos diferentes dias de teste para as duas soluções de sacarose 0,1M e 0,3M, confirmando a hipótese de que não há habituação ou sensibilização ao sabor por exposição seguida à sacarose, o que validou o modelo para avaliação da influência do ciclo estral sobre o TRS.

É interessante observar que, diferentemente dos jovens, não foi encontrada diferença nas respostas hedônicas entre os grupos controle e manipulado. Isto poderia indicar uma reversão dos efeitos da manipulação evidenciados na fase pré-púbere. Adicionalmente, estes dados corroboram com o trabalho de Wilmouth e Spear (2009) onde foi observado maior sensibilidade a estímulos apetitivos nos animais jovens quando comparados aos adultos. Porém, estes resultados contradizem os achados de outro trabalho que observou menor resposta hedônica no TRS em animais manipulados adultos (Silveira et al., 2010). É importante destacar que o trabalho foi realizado com ratos machos. Em outro estudo foi observado consumo similar de solução de sacarose entre machos e fêmeas em um teste de condicionamento odor/sabor (Bonacchi et al., 2008). No entanto, esta é uma tarefa relacionada à preferência por sabor e exige treinamento com exposição à solução de sacarose, o que envolve mecanismos encefálicos distintos do TRS. Outro fator que pode ter influenciado a diferença nos resultados é que no presente trabalho foram utilizados animais da linhagem Wistar, enquanto que Bonacchi e colaboradores utilizaram animais da linhagem Sprague-Dawley. Diferenças genéticas podem influenciar as respostas dos animais em diferentes tarefas comportamentais. Diferenças sexuais também podem influenciar muito os resultados, o que torna difícil a referência à maioria dos trabalhos, devido ao costume de utilizar animais machos nos estudos pré-clínicos. Diversos estudos demonstram a importância da ação hormonal na definição da masculinização ou feminização do encéfalo nas primeiras semanas de vida em roedores (Levine e Mullins, 1966; Amateau et al., 2004). Em fêmeas existe uma marcante influência hormonal na idade adulta, caracterizada pela flutuação hormonal durante o ciclo estral.

Tendo conhecimento que as respostas hedônicas não variaram com relação ao dia de teste, os dados das fêmeas adultas foram agrupados por fase do ciclo estral. Não foi encontrada diferença estatística significativa nas respostas hedônicas entre os grupos controle e manipulado para cada fase do ciclo estral. Estes resultados não corroboram com um trabalho que observou maior frequência de protrusões de língua à solução de sacarose 0,3M durante o diestro e o proestro, comparados com fêmeas em estro e metaestro e animais machos (Clarke e Ossenkopp, 1998). Porém, este trabalho realizou um agrupamento dos dados em diestro/proestro (níveis altos de estradiol) e estro/metaestro (níveis baixos de estradiol). Este agrupamento não é confiável, pois os

níveis hormonais são distintos para cada fase do ciclo estral, de modo que, sendo a intenção do trabalho avaliar a influência hormonal os dados deveriam ter sido analisados separadamente. Outro estudo observou menor número de lambidas para uma solução de 0,025M de sacarose durante o estro em comparação ao diestro (Atchley et al., 2005). No entanto, não foi observada diferença estatística para as soluções de sacarose 0,05M; 0,1M; 0,2M e 0,4M, ou seja, não houve diferença para concentrações similares às utilizadas no presente estudo. Um trabalho analisou a influência da manipulação neonatal sobre os níveis plasmáticos de estradiol no estro e no diestro, sem encontrar diferença dos grupos controle e manipulado (Severino et al., 2004). Tendo em vista a importância do estradiol sobre alterações na preferência por sabor (Gandelman, 1983), estes achados poderiam explicar a ausência de diferença entre animais controle e manipulado encontrada neste trabalho. Embora muitos trabalhos mostrem a influência hormonal no consumo alimentar em fêmeas (Laviano et al., 1996; Eckel, 2004) é importante ressaltar que os mecanismos encefálicos envolvidos no TRS não são os mesmos.

A avaliação do imunoconteúdo de receptor D2 e da enzima TH não revelou diferença estatística significativa entre os grupos controle e manipulado, tanto para os animais jovens quanto para os adultos. Porém, foi observada maior resposta hedônica à solução de sacarose nos animais manipulados jovens. Estes resultados podem sugerir que não há influência da manipulação neonatal sobre a atividade do sistema dopaminérgico. No entanto, outros parâmetros importantes não foram analisados, como o imunoconteúdo do transportador de dopamina, do receptor D1 ou a quantidade de dopamina liberada da ATV sobre os receptores dopaminérgicos no NAcc. Em estudo da influência da intervenção neonatal sobre a DA mesocorticolímbica não foi observada diferença na quantificação de receptores D1 e D2 ou transportador de dopamina no NAcc entre os grupos controle e manipulado utilizando machos adultos (Brake et al., 2004). Adicionalmente, outro trabalho não encontrou diferença nos níveis de DA e do seu metabólito DOPAC no NAcc de animais manipulados (Arborelius e Eklund, 2007). Segundo o trabalho de Hajnal e colaboradores (2004) ocorre liberação de dopamina após administração intraoral de soluções de sacarose. Além disso, em humanos foi observada liberação de DA no estriado dorsal após consumo de alimento palatável (Small, 2003). A DA, contudo, não parece ser responsável pelas alterações nas respostas hedônicas observadas em animais manipulados jovens no presente trabalho. Um estudo realizado com camundongos expressando menor quantidade de transportador de DA (*knockdown*), o que gera maior nível de DA na fenda sináptica, não observou aumento nas respostas orofaciais afetivas em comparação com controle (*wild-type*) (Peciña et al., 2003). Corroborando com estes achados, um trabalho que realizou a destruição de neurônios dopaminérgicos com 6-hidroxidopamina não observou alteração nas respostas orofaciais afetivas à solução de sacarose (Berridge et al., 1989). Portanto, a dopamina não parece estar diretamente relacionada com as respostas observadas no TRS.

Nos animais adultos não foi encontrada diferença nas respostas hedônicas entre os grupos controle e manipulado, assim como não houve diferença na avaliação do imunoconteúdo de receptor D2 e de TH. Apesar de as evidências mostrarem que a DA pode não estar relacionada com as respostas observadas no TRS, existe algum mecanismo encefálico relacionado com o TRS que está alterado nos animais manipulados jovens, um efeito que parece ter sido revertido nos animais adultos. Um estudo observou redução da densidade de espinhos dendríticos por reposição de estradiol no NAcc em fêmeas de hamster sírio (Staffend et al., 2011). Assim, o estradiol apresenta efeitos na morfofisiologia dos neurônios no accumbens. Estes achados podem estar relacionados com as diferenças observadas nos animais adultos, onde a ação de hormônios poderia ter revertido algum efeito da manipulação neonatal. Pesquisadores vêm estudando outros neurotransmissores relacionados com as respostas hedônicas. De Luca e colaboradores (2012) observaram um aumento das respostas hedônicas à solução de sacarose após administração intraperitoneal de delta-9-tetrahidrocanabinol, um agonista de receptores canabinóides CB1. Diversos trabalhos demonstram a ação de canabinóides no NAcc (para revisão: Oleson e Cheer, 2012). Outro trabalho demonstrou aumento das respostas orofaciais afetivas após administração de agonista opióide (DAMGO) no NAcc (Smith et al., 2011). De fato, foram identificados *hotspots* hedônicos na cápsula do NAcc que utilizam opióides e endocanabinóides para amplificar o sinal de “gostar” do sabor doce (Berridge, 2009a). Esses *hotspots* hedônicos são regiões muito restritas, como pequenas ilhas, encontradas em estruturas como o NAcc e o pálido ventral (Berridge, 2009b). Uma forma de reconhecer essas regiões é com microinjeção de agonistas opióides ou canabinóides seguida de administração intraoral de solução doce, quando os *hotspots* são estimulados precisamente há aumento da resposta hedônica ao sabor doce. Tendo em vista estes estudos, os achados do presente trabalho podem ser resultado de modificações em outros sistemas de neurotransmissores, não dopaminérgicos, como resultado da MN.

Conclusões

Os resultados do presente estudo demonstraram que a MN gerou um aumento das respostas orofaciais afetivas em fêmeas. Porém, estas alterações das respostas hedônicas só se manifestam durante a fase pré-púbere. Nas fêmeas adultas parece ocorrer uma reversão destas respostas, possivelmente como resultado da ação hormonal da maturidade sexual.

A análise de componentes do sistema dopaminérgico corrobora com outros trabalhos que demonstram que a DA não está envolvida nas respostas de “gostar”. Uma futura análise de outros sistemas de neurotransmissores pode ajudar a elucidar a influência da MN sobre o TRS, assim como a compreensão das modificações observadas nos adultos com relação aos jovens.

Referências bibliográficas

Scott JP. Critical periods in the development of social behavior in puppies. *Psychosom Med.* 1958 Jan-Feb;20(1):42-54.

Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science.* 1957 Aug 30;126(3270):405.

Sayers C, Sayers MA, Tsan-Ying L, Long CNH. The effect of pituitary adrenotropic hormone on the cholesterol and ascorbic acid content of the adrenal of the rat and the guinea pig. *Endocrinology* 38:1-9, 1946.

Bovard EW. The effects of early handling on viability of the albino rat. *Psychol Rev.* 1958 Sep;65(5):257-71.

Levine S, Lewis GW. Critical period for effects of infantile experience on maturation of stress response. *Science.* 1959 Jan 2;129(3340):42-3.

Levine S, Lewis GW. Developmental pattern of adrenal ascorbic acid in the rat. *Science.* 1963 Jan 11;139(3550):118-9.

Haltmeyer GC, Denenberg VH, Thatcher J, Zarrow MX. Response of the adrenal cortex of the neonatal rat after subjection to stress. *Nature.* 1966 Dec 17;212(5068):1371-3.

Schapiro S, Geller E, Eiduson S. Neonatal adrenal cortical response to stress and vasopressin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962 Apr;109:937-41.

Levine S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science.* 1967 Apr 14;156(3772):258-60.

Levine S. The pituitary-adrenal system and the developing brain. *Prog Brain Res.* 1970;32:79-85.

Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev* 1986; 396(1): 64-76.

Bartova, A. Functioning of the hypothalamo-pituitary-adrenal system during postnatal development in rats. *Gen and Comp Endocrinol* 1968; 10(2): 235-9.

Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto, R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 2003; 68(5): 439-45.

Levine S., Haltmeyer G. C.; Karas, G. C.; Denenberg, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav* 1967, 2: 55-9.

Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocr* 1999; 11(12): 925-33.

Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18(3): 195-200.

Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann NY Acad Sci* 1994; 30 (746): 275-88.

Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Devl Neurosci* 1998; 16: 149-64.

Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocr* 1989; 50(5): 597-604.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998; 19(3): 269-301.

Meaney M.J, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 1988; 239: 766-8.

Meaney MJ, Aitken DH, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging* 1991; 12: 31.

Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney, MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(9): 5335-40.

Francis DD, Diorio J, La Plante P, Weaver S, Seckl JR, Meaney MJ. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress and glucocorticoid receptors. *Ann NY Acad Sci* 1996; 20(794): 136-52.

Greenman MJ, Duhring FL. *Breeding and Care of the Albino Rat for Research Purposes*. Philadelphia: Wistar Institute of Anatomy and Biology, (2nd ed.), 1931.

Weininger O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. *Science*. 1954 Feb 26;119(3087):285-6.

Ruegamer WR, Bernstein L, Benjamin JD. Growth, food utilization, and thyroid activity in the albino rat as a function of extra handling. *Science*. 1954 Jul 30;120(3109):184-5.

Bovard EW Jr. A theory to account for the effects of early handling on viability of the albino rat. *Science*. 1954 Jul 30;120(3109):187.

Denenberg, VH. Interactive effects of infantile and adult shock levels upon learning. *Psychol Rep*. 1959, 5, 357-64.

Schaefer T Jr, Weingarten FS, Towne JC. Temperature change: the basic variable in the early handling phenomenon? *Science*. 1962 Jan 5;135(3497):41-2.

Ressler RH. Parental handling in two strains of mice reared by foster parents. *Science*. 1962 Jul 13;137(3524):129-30.

Denenberg VH, Smith SA. Effects of infantile stimulation and age upon behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 1963 Apr;56:307-12.

Ader R, Conklin PM. Handling of pregnant rats: effects on emotionality of their offspring. *Science*. 1963 Oct 18;142(3590):411-2.

Cowley JJ, Widdowson EM. The effect of handling rats on their growth and behavior. *Br J Nutr*. 1965;19(3):397-406.

Russell PA. "Infantile stimulation" in rodents: a consideration of possible mechanisms. *Psychological Bulletin* 1971, Vol. 75, No. 3, 192-202.

Levine, S. The effects of infantile experience on adult behaviour. In A. J. Bachrach (Ed.), *Experimental foundations of clinical psychology*. New York: Basic Books, 1962.

Spence JT, Mailer BA. Handling and noxious stimulation of the albino rat. I. Effects on subsequent emotionality. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1962, 55, 247-251.

Schaefer, T. The effects of early handling: Infant handling and later behaviour in the white rat. *Doctoral dissertation, University of Chicago, 1957.*

Bell RW, Nitschke W, Gorry TH, Zachman TA. Infantile stimulation and ultrasonic signaling: a possible mediator of early handling phenomena. *Dev Psychobiol*. 1971;4(2):181-91.

Lee MHS, Williams DI. Changes in licking behavior of rat mother following handling of young. *Anim Behav*, 1974, 22, 679-81.

Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocr* 1999; 11(12): 925-33.

Padoim MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 2001; 115(6): 1332-40.

Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocr* 1989; 50(5): 597–604.

Papaioannou A, Dafni U, Alikaridis F, Bolaris S, Stylianopoulou F. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neurosci* 2002; 114(1): 195-206.

Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 2004; 19(7): 1863-74.

Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA, Lucion AB, Dalmaz C. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci*. 2010 Feb;28(1):111-8.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav* 2004; 80: 739-45.

Silveira PP, Portella AK, Crema L, Correa M, Nieto FB, Diehl L et al. Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. *Physiol Behav* 2008; 93: 877–82.

Benetti CS, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS et al. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res* 2007; 62: 405– 11.

Silveira PP, Cognato G, Crema LM, Pederiva FQ, Bonan CD, Sarkis JJ et al. Neonatal Handling, Sweet Food Ingestion and Ectonucleotidase Activities in Nucleus Accumbens at Different Ages. *Neurochem Res* 2006; 31(5): 693-8.

Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*. 1954 Dec;47(6):419-27.

Carlezon WA, Wise RA. Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *J Neurosci* 1996, 16: 3112–3122.

Carr GD, White NM. Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sci* 1983, 33: 2551–2557.

Phillips AG, Fibiger HC. The role of dopamine in maintaining intracranial self-stimulation in the ventral tegmentum, nucleus accumbens, and medial prefrontal cortex. *Can J Psychol* 1978, 32: 58–66.

Haber SN; Knutson B. The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropharm* 2010, 35: 4 – 26.

Barron AB; Sovik E; Cornish JL. The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. *Frontiers in Behav Neurosci* 2010, 4: article 163.

Rivard, L., Srinivasan, J., Stone, A., Ochoa, S., Sternberg, P. W., and Loer, C. M. A comparison of experience-dependent locomotory behaviors and biogenic amine neurons in nematode relatives of *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neurosci* 2010, 11, 22.

Lechner, H. A., Baxter, D. A., and Byrne, J. H. Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: II. Neurophysiological correlates. *J Neurosci* 2000, 20, 3377–3386.

Kringelbach LM; Stein A; Hartevelt TJ. The functional human neuroanatomy of food pleasure cycles. *Physiology & Behav* 2012, 106: 307 – 316.

Pitchers KK; Frohmader KS; Vialou ; Mouzon E; Nestler EJ; Lehman MN; Coolen LM. Δ FosB in the nucleus accumbens is critical for reinforcing effects of sexual reward. *Genes, Brain and Behavior* 2010, 9: 831–840.

Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav.* 2009 Jul 14;97(5):537-50.

Steiner JE. The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants. *Symp Oral Sens Percep* 1973;4:254–78.

Steiner JE. Discussion paper: innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. *Ann NY Acad Sci* 1974;237:229–33.

Grill HJ, Norgren R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 1978a;143:263–79.

Grill HJ, Norgren R. The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res* 1978b;143:281–97.

Berridge KC. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000 Mar;24(2):173-98.

Peciña S, Berridge KC. Central enhancement of taste pleasure by intraventricular morphine. *Neurobiology* 1995;3:269–80.

Wise RA, Dawson V. Diazepam-induced eating and lever pressing for food in sated rats. *J Comp Physiol Psychol* 1974;86: 930–41.

Kelly TH, Foltin RW, King L, Fischman MW. Behavioral response to diazepam in a residential laboratory. *Biol Psychiatry* 1992;31:808–22.

Barnfield A, Parker LA, Davies AM, Miles C. Fenfluramine-induced modification of palatability: analysis by the taste reactivity test. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;48:875–9.

Rivera HM, Eckel LA. The anorectic effect of fenfluramine is increased by estradiol treatment in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 2005;86:331–7.

Duong A, Weingarten HP. Dopamine antagonists act on central, but not peripheral, receptors to inhibit sham and real feeding. *Physiol Behav* 1993, 54: 449–454.

Geary N and Smith GP. Pimozide decreases the positive reinforcing effect of sham fed sucrose in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1985, 22: 787–790.

Hsiao S and Smith GP. Raclopride reduces sucrose preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1995, 50: 121–125.

Schneider LH. Orosensory self-stimulation by sucrose involves brain dopaminergic mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1989, 575: 307–319.

Schneider LH, Davis JD, Watson CA, and Smith GP. Similar effect of raclopride and reduced sucrose concentration on the microstructure of sucrose sham feeding. *Eur J Pharmacol* 1990, 186: 61–70.

Smith GP and Schneider LH. Relationships between mesolimbic dopamine function and eating behavior. *Ann NY Acad Sci* 1988, 537: 254–261.

Brennan K, Roberts DC, Anisman H, and Merali Z. Individual differences in sucrose consumption in the rat: motivational and neurochemical correlates of hedonia. *Psychopharmacology (Berl)* 2001, 157: 269–276.

Hajnal A and Norgren R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res* 2001, 904: 76–84.

Sills TL and Vaccarino FJ. Individual differences in sugar consumption following systemic or intraaccumbens administration of low doses of amphetamine in nondeprived rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1996, 54: 665– 670.

Szczyepka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, and Palmiter RD. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 2001, 30: 819–828.

Hajnal A, Smith GP, Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R31–R37.

Wyvell CL, Berridge KC. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or response reinforcement. *J Neurosci* 2000; 20: 8122–30.

Schultz W. Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol*; 2006.

Ahn S, Phillips AG. Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *J Neurosci* 1999; 19: B1–B6.

Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1481–1489.

Koob GF e Moal ML. *Neurobiology of addiction*. Academic Press: New York; 2006.

Berridge KC, Venier IL, Robinson TE. Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behav Neurosci*. 1989 Feb;103(1):36-45.

Rideout HJ, Parker LA. Morphine enhancement of sucrose palatability: analysis by the taste reactivity test. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996 Mar;53(3):731-4.

Berridge, K. C., & Grill, H. J. Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. *Behavioral Neuroscience* 1983, 97, 563- 573.

Berridge, K. C., & Grill, H. J. Isohedonic tastes support a two-dimensional hypothesis of palatability. *Appetite* 1984, 5, 221-231.

Berridge KC, Treit D. Chlordiazepoxide directly enhances positive ingestive reactions in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:217– 21.

Steiner JE, Glaser D, Hawilo ME, Berridge KC. Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001 Jan;25(1):53-74.

Rozin P. Specific aversions and neophobia resulting from vitamin deficiency or poisoning in half-wild and domestic rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1968; 66:82–88.

Barnett SA. Behavior components in the feeding of wild and laboratory rats. *Behavior*. 1956; 9:24–42.

Rzoska J. Bait shyness, a study in rat behavior. *British Journal of Animal Behavior*. 1953; 1:128–135.

Berkenhout J. *Outlines of the Natural History of Great Britain and Ireland*. 1st ed. London: 1769.

McCarthy MM, Becker JB. *Neuroendocrinology of sexual behavior in the female*. Behavioral Endocrinology. 2nd ed. Cambridge, MA 2002; 117–152.

Lebron-Milad, K; Milad MR. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biology of Mood & Anxiety Disorders* 2012, 2:3.

Clarke SNDA, Ossenkopp KP. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 274: 718-24.

Gesell C, Fisher GL. Caffeine aversion and saccharin preference in rats without olfactory bulbs. *Physiol Behav* 1968; 3: 523–5.

Kemble ED, Schwartzbaum JS. Reactivity to taste properties of solutions following amygdaloid lesions. *Physiol Behav* 1969; 4: 981–5.

Staffend NA, Loftus CM e Meisel RL. Estradiol reduces dendritic spine density in the ventral striatum of female Syrian hamsters. *Brain Struct Funct* 2011; 215: 187–94.

Beatty WW. Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology: Sexual Differentiation*, edited by A. A. Gerall, H. Moltz, and I. L. Ward. New York: Plenum. 1992; 11: 85–128.

Flynn FW, Schulkin J, and Havens M. Sex differences in salt preference and taste reactivity in rats. *Brain Res Bull* 1993; 32: 91–5.

Laviano AM, Meguid J, Gleason Z-J, Yang, and T. Renvyle. Comparison of long-term feeding pattern between male and female Fischer 344 rats: influence of estrous cycle. *Am J Physiol* 1996; 270(2 pt 2): R413–9.

Beatty WW, O'Briant DA, and Vilberg TR. Effects of ovariectomy and estradiol injections in food intake and body weight in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 1975; 3: 539–44.

Stevens R. Estradiol benzoate potentiates the effects of bodyrestraint in suppressing food intake and reducing body weight. *Physiol Behav* 1989; 45: 1–5.

Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, Dalmaz C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76(2): 327-33.

Fantino M, and Brinnel H. Body weight set-point changes during the ovarian cycle: experimental study of rats using hoarding behavior. *Physiol Behav* 1986; 36: 991–6.

Ter Haar MB. Circadian and estrual rhythms in food intake in the rat. *Horm Behav* 1972; 3: 213–9.

Prescott, RG. Estrous Cycle in the Rat: Effects on Self-Stimulation Behavior. *Science*. 1966 May 6;152(3723):796-7.

Gandelman R. Gonadal hormones and sensory function. *Neurosci Biobehav* 1983; 7: 1–17.

Blaustein JD, Wade GN. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav* 1976; 17: 201–8.

Drewett RF. The meal patterns of the oestrous cycle and their motivational significance. *Q J Exp Psychol* 1974; 26: 489–94.

Eckel LA. Ingestive behaviour in female rats: influence of the ovarian cycle. *Appetite* 1999; 32: 274.

Eckel LA, Houtp TA, Geary N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol Behav* 2000; 70: 397–405.

Eckel LA. Estradiol: an indirect control of meal size. *Physiol Behav* 2004; 82: 35 – 41.

Kornstein SG. Chronic depression in women. *J Clin Psychiatry* 2002; 63: 602–9.

Oliver G, Wardle J. Perceived effects of stress on food choice. *Physiol Behav* 1998; 66: 511 – 5.

Kelly RH, Danielson BH, Zatzick DF, Haan MN, Anders TF, Gilbert WM et al. Chart-recorded psychiatric diagnoses in women giving birth in California in 1992. *Am J Psychiatry* 1999; 156(6): 955-7.

Harris RBS, Zhou J, Mitchell T, Hebert S, Ryan DH. Rats fed only during the light period are restraint to stress-induced weight loss. *Physiol Behav* 2002; 76: 543–50.

Bowyer JF, Frame LT, Clausing P, Nagamoto-Combs K, Osterhout CA, Sterling CR, Tank W. Long-term Effects of Amphetamine Neurotoxicity on Tyrosine Hydroxylase mRNA and Protein in Aged Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286 (2): 1074–1085.

Crema LM, Diehl LA, Aquiar AP, Almeida L, Fontella FU, Pettenuzzo L, Vendite D, Dalmaz C. Effects of chronic restraint stress and 17- β -estradiol replacement on oxidative stress in the spinal cord of ovariectomized female rats. *Neurochem Res*. 2010 Nov;35(11):1700-7.

Hajnal A, Kovacs P, Ahmed T, Meirelles K, Lynch CJ, Cooney RN. Gastric bypass surgery alters behavioral and neural taste functions for sweet taste in obese rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Oct;299(4):G967-79.

Flynn FW. Applications of taste reactivity to the study of the neural-hormonal controls of ingestive behavior. *Neurosci Behav Reviews* 1995; 19: 109-20.

Wilmouth CE, Spear LP. Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: Taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 92: 566–73.

Avena NM, Murray S, Gold MS. Comparing the effects of food restriction and overeating on brain reward systems. *Experimental Gerontology* 2013 48: 1062–1067.

Diaz-Cenzano E, Chotro MG. The effect of taste familiarity on intake and taste reactivity in infant rats. *Dev Psychobiol.* 2010 Mar;52(2):109-20.

Neath KN, Limebeer CL, Reilly S, Parker LA. Increased liking for a solution is not necessary for the attenuation of neophobia in rats. *Behav Neurosci.* 2010 Jun;124(3):398-404.

Bonacchi KB, Ackroff K, Sclafani A. Sucrose taste but not Polycose taste conditions flavor preferences in rats. *Physiol Behav.* 2008 Sep 3;95(1-2):235-44.

Levine S, Mullins RF Jr. Hormonal influences on brain organization in infant rats. *Science.* 1966 Jun 17;152(3729):1585-92.

Amateau SK, Alt JJ, Stamps CL, McCarthy MM. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2906-17.

Clarke SNDA, Ossenkopp KP. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 274: 718-24.

Atchley DP, Weaver KL, Eckel LA. Taste responses to dilute sucrose solutions are modulated by stage of the estrous cycle and fenfluramine treatment in female rats. *Physiol Behav.* 2005 Oct 15;86(3):265-71.

Severino GS, Fossati IAM, Padoin MJ, Gómes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav* 2004; 81: 489-98.

Gandelman R. Gonadal hormones and sensory function. *Neurosci Biobehav* 1983; 7: 1–17.

Laviano AM, Meguid J, Gleason Z-J, Yang, and T. Renvyle. Comparison of long-term feeding pattern between male and female Fischer 344 rats: influence of estrous cycle. *Am J Physiol* 1996; 270(2 pt 2): R413–9.

Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 2004; 19(7): 1863-74.

Arborelius L, Eklund MB. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience*. 2007 Mar 16;145(2):738-50.

Small, D.M. et al. (2003) Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage* 19: 1709–1715.

Peciña S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X. Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J Neurosci*. 2003 Oct 15;23(28):9395-402.

Staffend NA, Loftus CM e Meisel RL. Estradiol reduces dendritic spine density in the ventral striatum of female Syrian hamsters. *Brain Struct Funct* 2011; 215: 187–94.

De Luca MA, Solinas M, Bimpisidis Z, Goldberg SR, Di Chiara G. Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology*. 2012 Jul;63(1):161-8.

Oleson EB, Cheer JF. A brain on cannabinoids: the role of dopamine release in reward seeking. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Aug 1;2(8).

Smith KS, Berridge KC, Aldridge JW. Disentangling pleasure from incentive salience and learning signals in brain reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5;108(27):E255-64.

Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology & Behavior*. 2009 97: 537-50.

Berridge KC. Wanting and liking: Observations from the neuroscience and psychology laboratory. *Inquiry (Oslo)*. 2009 1 de agosto; 52(4).