

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOQUÍMICA

**ISOLAMENTO SOCIAL PRECOCE, ACESSO CRÔNICO À DIETA RICA EM
SACAROSE E A PROGRAMAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO:
SUSCEPTIBILIDADE A PSICOESTIMULANTES E A ALIMENTO PALATÁVEL NA
VIDA ADULTA**

Carine Lampert

Porto alegre

2017

Carine Lampert

**ISOLAMENTO SOCIAL PRECOCE, ACESSO CRÔNICO À DIETA RICA EM
SACAROSE E A PROGRAMAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO:
SUSCEPTIBILIDADE A PSICOESTIMULANTES E A ALIMENTO PALATÁVEL NA
VIDA ADULTA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carla Dalmaz

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Lampert, Carine

Isolamento social precoce, acesso crônico à dieta rica em sacarose e a programação do sistema dopaminérgico: susceptibilidade a psicoestimulantes e a alimento palatável na vida adulta / Carine Lampert. -- 2017.

125 f.

Orientadora: Carla Dalmaz.

Coorientadora: Maria Elisa Calcagnotto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Isolamento Social. 2. Dieta rica em Sacarose. 3. Sistema Dopaminérgico. 4. Abuso de drogas. 5. Compulsão alimentar. I. Dalmaz, Carla, orient. II. Calcagnotto, Maria Elisa, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha
irmã Claudete, pelo apoio incondicional da vida inteira.*

AGRADECIMENTOS

À toda minha família:

Aos meus pais por todo o amor, carinho e apoio, ao seu modo, e pelo suporte de todas as maneiras que podiam;

Aos meus irmãos que, da mesma forma, sempre me incentivaram e me deram todo o apoio ao longo desta jornada;

Em especial à minha irmã Claudete que sempre esteve próxima, desde o início da minha existência, participou de perto e teve papel crucial em todas as decisões e conquistas da minha vida. E neste momento, em especial, foi extremamente compreensiva, amorosa e fez o que pode para deixar meus dias extenuantes de escrita mais leves e doces;

Às minhas sobrinhas que alegraram meus dias, em especial à Isabel, minha sobrinha e afilhada que acompanhou de perto meus dilemas e alegrias do doutorado, e pela compreensão pela falta de tempo de acompanhá-la em todas as suas aventuras.

Às minhas orientadoras:

Profa. Carla Dalmaz, minha orientadora, que me acolheu, acreditou em mim e sempre me deu o apoio para encarar todos os desafios. Pela paciência, atenção, dedicação e por todos os ensinamentos ao longo desses 7 anos de laboratório 37.

À Profa. Maria Elisa Calcagnotto, minha co-orientadora, que da mesma forma, aceitou o desafio de me ensinar sobre o intrigante mundo da eletrofisiologia, por ter acreditado em mim e por me fornecer todo o suporte necessário.

À Profa. Deusa Vendite, minha orientadora do mestrado e orientadora da vida, minha amiga, por todo o apoio emocional e na análise dos dados, por acreditar em mim e permanecer próxima mesmo após ter encerrado seus trabalhos como professora e pesquisadora.

Aos colegas e amigos do laboratório 37:

À Danusa que iniciou nesta jornada comigo e sempre foi parceira, amiga, para todas as horas, as horas de lab e também fora dele.

À Nati, pela paciência em discutir resultados, projetos (projetos de pesquisa e projetos de vida), pela amizade e parceria de todas as horas.

À Aline pela paciência, pelos bolos e doces divinos, e pela imprescindível ajuda com os animais.

A todos os colegas de lab 37 que participaram em algum momento desta trajetória: à Rachel pelo incentivo e motivação constantes; à Ana, e à Camilla pelas conversas descontraídas. A todos os ICs que deram um apoio fundamental para a realização dos experimentos, em especial à Emily, Carol, Raquel e Fabrício.

Aos colegas da eletrofisiologia, principalmente à Francine e à Grace, pela alegria, paciência e espírito de ajuda incondicional durante os experimentos.

Aos amigos de fora do laboratório que me deram todo o apoio e incentivo e alegraram meus dias ao longo desses anos.

Aos professores da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica pela oportunidade de realizar o doutorado. Aos órgãos financiadores de pesquisa, em especial à CAPES pela bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento!

SUMÁRIO

PARTE I

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Infância e adolescência: períodos sensíveis do desenvolvimento	5
1.2 Estresse no início da vida	7
1.3 Estresse e o sistema de recompensa	10
1.4 Neurobiologia dos comportamentos aditivos	13
1.5 Estresse, adição e diferenças sexo-específicas	21
1.6 Sensibilização cruzada: estresse & alimento palatável & uso de drogas	22
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos específicos	27

PARTE II

4. MATERIAS, MÉTODOS E RESULTADOS	28
4.1 CAPÍTULO I: <i>Short post-weaning social isolation induces long-term changes in the dopaminergic system and increases susceptibility to psychostimulants in female rats.</i>	30
4.2 CAPÍTULO II: <i>Short post-weaning social isolation induces long-term changes in dopaminergic system and increases sweet food seeking in female rats</i>	41
4.3 CAPÍTULO III: Efeitos do isolamento social no período pré-púbere associado a dieta rica em sacarose sobre a preferência condicionada de lugar para metilfenidato e a transmissão sináptica excitatória no núcleo accumbens	68

PARTE III

5. DISCUSSÃO.....	80
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
7. PERSPECTIVAS	100
REFERÊNCIAS	102

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

AMPH – Anfetamina

CEPS – Correntes excitatórias pós-sinápticas

CPP – Preferência condicionada de lugar (do inglês – *conditioned place preference*)

CRF – Fator liberador de corticotropina (do inglês – *corticotropin-releasing factor*)

DA - Dopamina

D1R- Receptor D1 de dopamina

D2R - Receptor D2 de dopamina

DAT – Transportador de dopamina

DRS – Dieta rica em sacarose

DEP - Dietilpropiona

DSM - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais

ERO – Espécies reativas de oxigênio

HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal

IS - Isolamento Social

MPH – Metilfenidato (do inglês – *methylphenidate*)

NAc – Núcleo accumbens

NMDA - N-metil-D-aspartato

PN – Dia pós-natal

TH – Tirosina hidroxilase

VTA - Área tegmental ventral (do inglês – *ventral tegmental area*)

RESUMO

A infância e a adolescência são períodos sensíveis de maturação neuronal, caracterizados por alta plasticidade de circuitos encefálicos em desenvolvimento, como é o caso do sistema mesolímbico dopaminérgico. Experiências estressantes neste período, como o isolamento social (IS), podem produzir neuroadaptações nesses circuitos e aumentar a vulnerabilidade ao consumo de drogas e de alimentos palatáveis ao longo da vida. Tendo em vista que extensa literatura analisa longos períodos de isolamento social, que não são modelos adequados para o estresse por isolamento que ocorre em sociedades humanas, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de uma exposição curta ao isolamento social durante o período pré-púbere sobre o sistema mesolímbico dopaminérgico e a susceptibilidade para o abuso de drogas e para o consumo compulsivo de alimento palatável em ratas Wistar fêmeas, na idade adulta. Também foi objetivo avaliar o papel da exposição crônica a uma dieta rica em sacarose (DRS) sobre estas variáveis. Como resultados, foi observado que o IS aumentou a resposta locomotora a um desafio com anfetamina, bem como aumentou, no estriado dorsal, o imunocontéudo do transportador de dopamina, da enzima tirosina hidroxilase e diminuiu os níveis do receptor D2 de dopamina (D2R); além disso, os animais submetidos ao IS na pré-puberdade apresentaram aumento nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo após o desafio. De modo interessante, a exposição a DRS preveniu os efeitos do IS sobre a resposta locomotora, mas não afetou os parâmetros dopaminérgicos. O IS também diminuiu o imunocontéudo basal de D2R no núcleo accumbens (NAc) e estimulou o consumo do tipo-compulsivo de alimento doce (Froot Loops®). A DRS não interferiu nestes parâmetros. Observamos também que o IS não alterou os níveis basais de corticosterona plasmática, enquanto que a DRS diminuiu tais níveis. Os registros das correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) espontâneas indicaram, como resultado preliminar, que a DRS reduziu o tempo de subida das CEPS, indicando uma resposta glutamatérgica fugaz. Os achados deste estudo demonstram pela primeira vez que um período curto de IS em uma fase crítica do desenvolvimento é capaz de programar o sistema mesolímbico dopaminérgico de forma a aumentar a susceptibilidade tanto ao uso de drogas quanto ao consumo do tipo-aditivo de alimento doce. Esses efeitos podem ser em parte explicados pela redução dos níveis de D2R basal no NAc e pela maior estimulação do sistema dopaminérgico no estriado frente a um desafio com anfetamina. Os achados desta tese sugerem que experiências estressantes, como o isolamento social, durante um período crítico do desenvolvimento é capaz de programar o sistema de recompensa encefálico de forma permanente e aumentar a susceptibilidade a comportamentos aditivos na vida adulta. Identificar fatores preditores de propensão a esse tipo de comportamento é importante para prevenir o desenvolvimento de dependência de drogas e/ou de distúrbios alimentares, além de possibilitar a identificação de alvos terapêuticos e o desenvolvimento de estratégias de tratamento para estes distúrbios.

Palavras Chave: Estresse no início da vida; Isolamento social; Dieta rica em sacarose; Abuso de drogas; Compulsão alimentar

ABSTRACT

Childhood and adolescence are sensitive periods of neuronal maturation, characterized by high plasticity of developing brain circuits, such as the mesolimbic dopaminergic system. Stressful experiences in these periods, such as social isolation (SI), can produce changes in these circuits and increase vulnerability to drug addiction and eating disorders throughout life. Considering that most of literature analyze long periods of social isolation, that are not good models for social stress in human societies, the objective of this study was to investigate the effects of a short post-weaning social isolation on mesolimbic dopaminergic system and the susceptibility to drug and food addiction in female Wistar rats in adulthood. Moreover, we also aimed to evaluate the role of a chronic high sugar diet (HSD) on these variables. It was observed that SI increased the locomotor response to a challenge with amphetamine (AMPH), as well as increased the immunoccontent of dopamine transporter, the enzyme tyrosine hydroxylase, decreased the D2 dopamine receptor (D2R) and increased the parameters related to oxidative stress in dorsal striatum after the challenge. Interestingly, exposure to DRS prevented the effects of SI on locomotor response, but did not affect dopaminergic parameters. SI also decreased the basal immunoccontent of D2R in the nucleus accumbens (NAc), and stimulated binge eating of high sweet food (Froot Loops®). HSD did not interfere with these parameters. We also observed that SI did not alter plasma corticosterone baseline levels after SI, whereas HSD induced a decrease in these levels. Excitatory postsynaptic currents (EPSC) indicated, as a preliminary result, that the exposure to a HSD reduced the rise time, indicating a more fleeting glutamatergic response. The findings of this study demonstrate for the first time that a short period of SI at a critical period of development is able to programme the mesolimbic dopaminergic system in order to increase susceptibility to both drug and food addiction. These results are possibly due, at least in part, to low basal levels of D2R in NAc and the higher stimulation of the dopaminergic system in striatum after a challenge with AMPH. The findings of this thesis suggest that stressful experiences such as social isolation during a critical period of development are able to permanently program the brain reward system and increase the susceptibility to addictive behaviors in adult life. Identifying predisposing factors to this type of behavior is extremely important to prevent the development of drug addiction and/or eating disorders, to identify therapeutic targets and to enable the development of treatment strategies for these disorders.

Keywords: Early life stress; Social isolation; High sugar diet; Drug abuse; Food addiction

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infância e adolescência: períodos sensíveis do desenvolvimento

A infância e a adolescência são períodos sensíveis de maturação do sistema nervoso, marcados por uma alta plasticidade de circuitos encefálicos em desenvolvimento, como é o caso das regiões corticais e límbicas (Brydges et al., 2015; Carr et al., 2013; Dwyer e Leslie, 2016; Oswald et al., 2014; Rodrigues et al., 2011; Spear, 2000; Tottenham e Galvan, 2016). A formação/maturação de sinapses inicia na fase embrionária e se estende até a adolescência/início da vida adulta (Jiang e Nardelli, 2016). Durante estes períodos, as sinapses e conexões neuronais estão sujeitas a alterações induzidas por programação genética (van Dyck e Morrow, 2017) e pelas interações com o meio ambiente (Jiang e Nardelli, 2016). Estas interações entre eventos ambientais e predisposição genética impulsionam a maturação dos circuitos encefálicos (Matas et al., 2016). Neste contexto, a exposição a diferentes experiências pode afetar os processos envolvidos no desenvolvimento neural, como o crescimento neuronal, a gliogênese, a mielinização e a poda sináptica (Holder e Blaustein, 2014), desse modo, interferindo no remodelamento sináptico e induzindo alterações a longo prazo nos circuitos e na conectividade cerebral (Carr et al., 2013; van Dyck e Morrow, 2017).

Em humanos, a adolescência/puberdade se inicia quando começa a ocorrer uma maturação social e cognitiva, associada a alterações hormonais, por volta dos 12 anos de idade (Holder e Blaustein, 2014). Em roedores, o marco para a puberdade em fêmeas é a abertura vaginal, que ocorre por volta do 35º dia pós-natal (PN) (Burke et al., 2017). A fase que sucede o desmame e que antecede a puberdade/adolescência, em roedores, é chamada de pré-puberdade, ou início da adolescência (Burke et al., 2017; Tirelli et al., 2003).

Um dos sistemas que ainda está em maturação durante a infância e adolescência e permanece em desenvolvimento até o início da vida adulta é o sistema dopaminérgico (Burke e Miczek, 2014). Na Fig. 1 é possível observar a representação esquemática da maturação do sistema dopaminérgico ao longo do desenvolvimento, que se estende até o início da vida adulta. Neste desenho esquemático, extraído de Burke & Miczek (2014), está representada a maturação das fibras dopaminérgicas, da atividade dopaminérgica e dos receptores dopaminérgicos, de acordo com os estágios da vida (infância, adolescência e vida adulta) e de acordo com as regiões encefálicas: córtex pré-frontal, estriado e núcleo accumbens (NAc), em roedores. O período entre os dias PN21-40, em especial, é um período crítico de alterações, principalmente no NAc e estriado, que incluem aumento das fibras dopaminérgicas, da atividade dopaminérgica e subsequente estabilização e, também, envolve um aumento acentuado de receptores dopaminérgicos e subsequente poda sináptica (Burke e Miczek, 2014). A exposição a condições adversas nestas fases iniciais da vida pode interferir no desenvolvimento funcional do sistema dopaminérgico e aumentar o risco de transtornos mentais e a vulnerabilidade a comportamentos aditivos (Burke e Miczek, 2014; Matas et al., 2016; Volkow e Li, 2004).

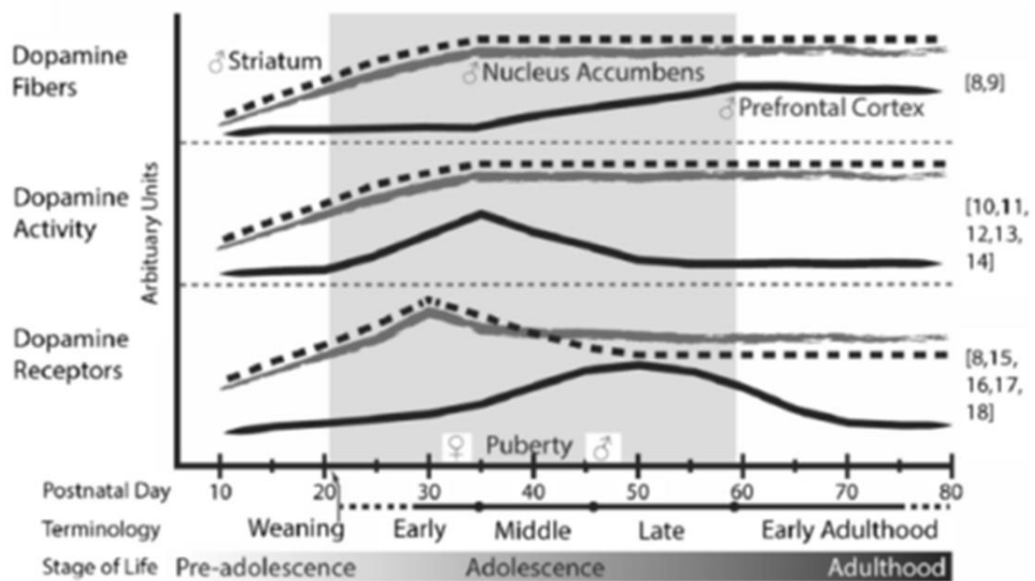


Fig. 1: Desenho esquemático da maturação do sistema dopaminérgico durante o desenvolvimento. Ontogenia estimada das fibras dopaminérgicas, da atividade dopaminérgica e dos receptores de dopamina no estriado (linha preta tracejada), núcleo accumbens (linha cinzenta) e córtex pré-frontal (linha preta sólida) durante as diferentes fases da vida, em roedores. Fonte: Burke & Miczek (2014).

1.2 Estresse no início da vida

O estresse é amplamente entendido como a pressão ambiental sobre um organismo vivo, o que pode potencialmente perturbar a homeostase e evocar uma cascata de respostas adaptativas (Gordon, 2002). O estresse agudo geralmente ativa as respostas adaptativas, porém o estresse prolongado leva a um desgaste (carga alostática) dos sistemas regulatórios, resultando em alterações biológicas que enfraquecem os processos adaptativos relacionados ao estresse e aumentam a susceptibilidade a doenças (Yau e Potenza, 2013).

Estudos pré-clínicos realizados com roedores e primatas mostram que o estresse experimentado no início da vida induz uma série de eventos fisiológicos, neurobiológicos e hormonais, que resultam em uma desregulação de vias do sistema de recompensa e de resposta ao estresse e parecem facilitar a autoadministração de diferentes drogas de abuso (Brydges et al., 2015; Doom et al., 2016; Fareri e Tottenham, 2016; McCormick, 2010; Neisewander et al., 2012; Tottenham e Galvan, 2016; Volkow e Li, 2004). Além disso, a exposição a eventos estressores tem sido relacionada a um maior risco de desenvolver distúrbios alimentares, como anorexia, bulimia e transtorno de compulsão alimentar (Brewerton, 2017; Yau e Potenza, 2013), principalmente quando ocorre nas fases iniciais da vida (Uzunian e Vitalle, 2015). Um estudo com dados de 21 países mostrou que a exposição a adversidades na infância explica quase 30% dos casos de transtornos psiquiátricos na vida adulta (Kessler et al., 2010).

1.2.1 Isolamento social

O ser humano, assim como os roedores, tem uma necessidade instintiva de se relacionar (Bhatti e Haq, 2017), de modo que interações sociais, principalmente durante as fases iniciais da vida, são de extrema importância para o bom desenvolvimento emocional dos indivíduos (Manduca et al., 2016; Uzunian e Vitalle, 2015; Vanderschuren et al., 2016). A ausência de laços e a privação da interação social podem causar diferentes alterações comportamentais que podem se manifestar na vida adulta (Butler et al., 2016; Neisewander et al., 2012). A negligência física e emocional observada em humanos é um dos tipos de estresse frequentemente visto no início da vida, resulta no desamparo da criança e/ou adolescente e as marcas

geradas são graves e duradouras (Carr et al., 2013). Estudos relatam que indivíduos expostos a abuso e negligência emocional e física durante a infância apresentam algum tipo de doença psiquiátrica e aumento no consumo de drogas ao longo da vida (Goodman et al., 2016; Schneeberger et al., 2017; Shin et al., 2013).

Nos modelos animais o isolamento social (IS) é comumente utilizado como um modelo de estresse crônico e é capaz de induzir em roedores uma série de comportamentos similares àqueles observados em humanos que passam por alguma experiência adversa (Heidbreder et al., 2000; Yorgason et al., 2013). O comportamento de brincadeira tipicamente observado em animais no período pré-púbere, é essencial para a maturação saudável dos circuitos encefálicos em desenvolvimento e diversos estudos têm evidenciado consequências negativas associadas à limitação de interação social no período que varia entre o desmame (PN21) até a vida adulta (P60) (Burke et al., 2017; Fone e Porkess, 2008).

O modelo de isolamento social tipicamente utilizado na maioria dos estudos até o momento envolve a individualização do animal a partir do desmame, variando entre os dias PN21 a PN28 e geralmente se estende até a vida adulta (Burke et al., 2017). Neste contexto, o animal é impedido de ter qualquer contato social, apenas tem acesso a pistas olfativas e auditivas de dentro da sua caixa moradia. Na maioria dos estudos, as análises comportamentais e neuroquímicas são feitas durante o período de isolamento (Burke et al., 2017; Fone e Porkess, 2008).

Evidências apontam que longos períodos de isolamento social podem induzir alterações no sistema de recompensa de modo a estimular o consumo de drogas de abuso (Brydges et al., 2015; Fareri e Tottenham, 2016; McCormick, 2010; Neisewander et al., 2012; Tottenham e Galvan, 2016). Deve-se ressaltar, porém, que

a grande maioria dos estudos conduzidos até o momento em modelos animais investigou longos períodos de isolamento social (mais de 6 semanas), geralmente desde o desmame até a vida adulta, e pouco se sabe sobre os efeitos de um período curto de isolamento social, em uma fase específica do desenvolvimento.

1.3 Estresse e o sistema de recompensa

A principal resposta fisiológica ao estresse consiste na estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA): neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo liberam o fator liberador de corticotropina (CRF - *Corticotropin-releasing factor*) e vasopressina na hipófise anterior, os quais estimulam a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrópico, estimulando ambas a síntese e a liberação de glicocorticoides das glândulas adrenais (Bobzean et al., 2014). A liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) faz parte da resposta ao estresse (Holder e Blaustein, 2014; Toth et al., 2011). Esses hormônios são capazes de modular diversos sistemas encefálicos, como, por exemplo, o sistema dopaminérgico (Chen et al., 2017; Majcher-Maslanka et al., 2017; Yau e Potenza, 2013). Estudos mostram que a adrenalectomia diminui a liberação de dopamina durante a administração de uma droga em regiões envolvidas com a resposta à recompensa e o tratamento com corticosterona reverte este efeito (Yau e Potenza, 2013).

Experiências estressantes, além de estarem associadas a uma maior incidência de uso de drogas, têm sido associadas também a uma maior motivação para consumir alimentos palatáveis (ricos em sacarose e lipídios) (Adam e Epel, 2007; Dallman et

al., 2005; Epel et al., 2001; MacKay et al., 2014; Pecoraro et al., 2004; Ulrich-Lai, 2016). Isto se deve ao fato do estresse afetar circuitos encefálicos comuns a distúrbios aditivos relacionados tanto a drogas quanto a alimentos palatáveis (Hardaway et al., 2015; Sinha e Jastreboff, 2013; Yau e Potenza, 2013).

1.3.1 Estresse e alimentos palatáveis

“People may very well choose to trade off years of their life, or the possibility of disease or injury, in exchange for the current pleasure, excitement, or stress relief they get from food.” Jacob Sullum (Apud, Adam e Epel, 2007).

Situações estressantes alteram o comportamento alimentar de 80% dos indivíduos, seja aumentando o consumo calórico ou reduzindo-o, mas o que ocorre principalmente é uma mudança na origem das calorias ingeridas, observando-se um aumento de calorias proveniente de alimentos altamente palatáveis (Adam e Epel, 2007; Dallman, 2010). Estudos em condições controladas de estresse e ingestão calórica evidenciaram que em uma situação de estresse agudo, seja físico ou emocional, ocorre um aumento na ingestão de alimentos palatáveis, mesmo em situações de saciedade, quando não há a necessidade homeostática de ingestão calórica (Rutters et al., 2009). O fácil acesso a alimentos palatáveis, aliado à rotina estressante da sociedade atual facilita o consumo abusivo desse tipo de alimento e intensifica suas consequências. Além disso, crianças e adolescentes são mais propensos a ingerir esse tipo de alimento (De Cosmi et al., 2017; Morin et al., 2017) e são mais susceptíveis aos seus efeitos programadores no sistema de recompensa.

Foi observado que a ingestão calórica, principalmente de alimentos palatáveis, tem o intuito de amenizar os efeitos do estresse, tendo em vista a sensação de bem

estar que ela causa (Pecoraro et al., 2004; Ulrich-Lai, 2016). Isto acontece por que os alimentos palatáveis são capazes de atuar reduzindo a ativação do eixo HPA (Dallman, 2010; Yau e Potenza, 2013).

Além dos efeitos confortantes dos alimentos palatáveis, nos últimos anos estudos evidenciaram que o consumo de alimentos ricos em sacarose podem induzir alterações na função e sensibilidade do sistema dopaminérgico e podem gerar uma sensação de recompensa e desejo comparável em magnitude com aquela induzida por drogas de abuso (Ahmed et al., 2013; Avena et al., 2008; Collins et al., 2015; Lenoir et al., 2007). O consumo intenso e prolongado de alimentos ricos em sacarose pode ser um fator facilitador para o abuso de drogas (Avena et al., 2004; Avena e Hoebel, 2003), e vice-versa (Canan et al., 2017; Tomasi et al., 2015), sendo, portanto, o consumo excessivo de alimentos ricos em açúcar, *per se*, um fator de risco para o uso de drogas.

1.3.2 Estresse e uso de drogas

Vasta literatura denuncia a interação entre estresse e maior risco de uso de drogas. Diversos trabalhos, utilizando diferentes protocolos de estresse, têm evidenciado um aumento na busca e administração de diferentes drogas, lícitas e ilícitas em situações de estresse (Burke e Miczek, 2014; Garcia-Keller et al., 2013; Neisewander et al., 2012; Yorgason et al., 2016). Estudos utilizando isolamento social evidenciaram um aumento na liberação de dopamina no NAc e maior atividade locomotora em resposta à psicoestimulantes (Baarendse et al., 2014; Fabricius et al., 2010; Stairs et al., 2011; Westenbroek et al., 2013), bem como um aumento na auto-administração de diferentes drogas, como cocaína (Baarendse et al., 2014;

Westenbroek et al., 2013), álcool (Cortes-Patino et al., 2016; Kucher et al., 2016) e anfetamina (AMPH) (Stairs et al., 2011). Entretanto, a maioria destes estudos analisaram longos períodos de isolamento social (Butler et al., 2016; Kucher et al., 2016; Lander et al., 2017; Lukkes et al., 2009; Shao et al., 2015; Toth et al., 2011). Esses longos períodos não representam adequadamente modelos de estressores que ocorrem durante a infância em humanos, pois nesse caso a exposição a tal estressor, embora possa ser crônica, dificilmente abrange o período da infância até a idade adulta. Nesse sentido, pouco se sabe sobre os efeitos de um período curto de IS nas fases iniciais da vida sobre a sensibilidade a drogas, e especialmente se tal exposição é capaz de programar a longo prazo essa sensibilidade.

1.4 Neurobiologia dos comportamentos aditivos

Segundo a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – o DSM-5, a característica essencial de um transtorno por uso de substâncias consiste na presença de um conjunto de sintomas cognitivos, fisiológicos e comportamentais indicando o uso contínuo pelo indivíduo, apesar dos problemas significativos relacionados à substância. A dependência de drogas é um distúrbio bem estabelecido e os sintomas relacionados ao uso e à abstinência estão descritos na última edição do DSM-5. Por outro lado, as propriedades aditivas dos alimentos palatáveis e o reconhecimento dos distúrbios relacionados ao apetite como um comportamento aditivo é bastante recente e controverso (Amianto et al., 2015; Cathelain et al., 2016; Meule e Gearhardt, 2014).

1.4.1 O alimento como um componente aditivo

O consumo excessivo de alimentos altamente calóricos, bem como o uso de substâncias psicoativas, está associado a perturbações no funcionamento do sistema de recompensa e pode levar ao desenvolvimento de adição (Bak-Sosnowska, 2017). Tem-se observado que indivíduos que apresentam algum nível de compulsão alimentar se assemelham no comportamento àqueles com algum tipo de dependência de drogas (Avena et al., 2011; Davis et al., 2017; Murphy et al., 2014). A hipótese de que o alimento possa levar a comportamentos semelhantes aos observados no abuso de drogas é embasada no fato de que a exposição a determinados alimentos altamente palatáveis é capaz de alterar circuitos encefálicos envolvidos com o sistema de recompensa, estimulando um fenótipo comportamental de compulsão alimentar que remete à adição (Avena et al., 2011; Dimitrijevic et al., 2015; Schulte et al., 2017).

O termo “*food addiction*”, que se refere ao alimento como um potencial fator aditivo, e vou me referir a ele nesta tese como “comportamento alimentar do tipo-aditivo” foi descrito pela primeira vez em 1956 (Randolph, 1956), porém apenas na última década este tema foi retomado e recebeu maior atenção (Brewerton, 2017; Davis, 2017; Gearhardt et al., 2011b). As pesquisas realizadas pelos grupos de Gearhardt e Avena ampliaram substancialmente a literatura acerca do contexto aditivo sobre os transtornos alimentares (Avena, 2010; Avena et al., 2011; Avena et al., 2012; Gearhardt et al., 2009a; Gearhardt et al., 2011a; Gearhardt et al., 2011b). Estes pesquisadores defendem a visão de um comportamento do tipo-aditivo frente ao alimento por conta dos efeitos que determinados alimentos causam no sistema dopaminérgico e do potencial de gerar comportamentos de busca semelhantes aos observados na dependência de drogas (Avena, 2010; Gearhardt et al., 2011a). Gearhardt e colaboradores (2009) desenvolveram a escala para determinação da

ingestão aditiva de alimento (“*Yale Food Addiction Scale*”). A partir dela foi possível avaliar diferentes aspectos do comportamento alimentar relacionando-os aos critérios estabelecidos no DSM-5 para a dependência de substâncias (Gearhardt et al., 2009b; Schulte e Gearhardt, 2017). A presença de 3 ou mais critérios indicam a dependência, que incluem: consumir grandes quantidades de alimento em um curto período de tempo; comer mais do que o necessário para satisfazer as necessidades energéticas do organismo, indicando a perda de controle sobre a quantidade consumida e continuar consumindo o alimento apesar das consequências negativas (Bak-Sosnowska, 2017; Dimitrijevic et al., 2015; Gearhardt et al., 2009a).

Nas últimas décadas, o avanço da indústria alimentícia permitiu o desenvolvimento de alimentos com maior palatabilidade, a fim de estimular o consumo. Estes alimentos altamente processados apresentam em sua composição um conjunto de fatores capazes de estimular de forma muito mais intensa o sistema de recompensa do que os alimentos encontrados na natureza (Dimitrijevic et al., 2015). Estes alimentos são altamente calóricos, ricos em açúcar, gordura e aditivos (principalmente os que realçam o sabor), são de fácil acesso e geralmente são consumidos em maior quantidade do que o planejado originalmente (Bak-Sosnowska, 2017; Westwater et al., 2016). A maior capacidade de ativação do sistema de recompensa por este tipo de alimento, aliada ao consumo excessivo, além das necessidades fisiológicas individuais é o que confere a este tipo de alimento um potencial aditivo (Dimitrijevic et al., 2015). No entanto, outros autores discordam desta designação pelo fato de os alimentos serem necessários à sobrevivência (Nolan, 2017). Contudo, este tipo de alimento não é derivado do nosso ambiente “natural” e não é essencial à vida (Davis, 2017). Neste contexto, o principal problema é que os

alimentos evoluíram, porém, o sistema de recompensa continua bem conservado, e continua entendendo um alimento altamente saboroso/calórico como algo saudável e importante para a sobrevivência, reforçando assim o comportamento de busca por este tipo de alimento.

Além disso, um estado considerado de “adição” para alimentos está intimamente envolvido com distúrbios alimentares, mais especificamente aqueles relacionados ao transtorno da compulsão alimentar periódica e à obesidade (Avena et al., 2008; Bak-Sosnowska, 2017; Pedram et al., 2013), apesar de muitos indivíduos que se enquadram nos critérios de comportamento alimentar do tipo-aditivo não serem obesos (Nolan, 2017). De qualquer forma, a identificação de um padrão de consumo compulsivo e o diagnóstico de comportamento alimentar do tipo-aditivo é importante para direcionar o indivíduo a um tratamento adequado e assim minimizar os efeitos deletérios causados por este distúrbio.

1.4.2 Ativação do sistema dopaminérgico

Todas as substâncias com potencial aditivo têm em comum a ativação direta do sistema de recompensa encefálico. Diversos sistemas são ativados em resposta à recompensa: os sistemas dopaminérgico, colinérgico, serotoninérgico, opioidérgico (Avena et al., 2008), entre outros. Entretanto, o sistema dopaminérgico é um dos principais circuitos envolvidos nos processos de recompensa e na sensibilização a diferentes tipos de substâncias (Davis et al., 2008; Manduca et al., 2016; Murray et al., 2014; Reichelt, 2016; Rodrigues et al., 2011; Trainor, 2011; Vanderschuren et al., 2016), estando envolvido no reforço de comportamentos e na produção de memórias. A via mesolímbica dopaminérgica consiste na ativação de neurônios dopaminérgicos

da VTA que se projetam para o estriado ventral (que inclui o NAc) e é crucial para a recompensa de drogas (Cooper et al., 2017; Volkow et al., 2011). Outras vias dopaminérgicas, como a mesoestriatal (neurônios dopaminérgicos da substância *nigra* que se projetam para o estriado dorsal) e a via mesocortical (células dopaminérgicas da VTA se projetam para o córtex pré-frontal), também, são reconhecidas no reforço de comportamentos envolvidos na adição (Volkow et al., 2011).

O estriado (dorsal e ventral) é composto predominantemente por neurônios espinhosos médios (MSN), que expressam receptores de dopamina (DA) do tipo D1R ou D2R, ou ambos (Cooper et al., 2017; Scofield et al., 2016). Os receptores de DA contribuem para a expressão da sensibilização comportamental e atuam na regulação da resposta à recompensa (Shi e McGinty, 2011). Cinco tipos de receptores dopaminérgicos foram identificados. Eles podem ser divididos em duas classes: receptores do tipo D1 (D1 e D5) e receptores do tipo D2 (D2, D3 e D4) (de Jong et al., 2015). Receptores do tipo D1R apresentam menor afinidade à dopamina, portanto são preferencialmente ativados quando ocorre grande liberação de dopamina transitoriamente, mediada por disparos fásicos de neurônios dopaminérgicos, durante a ingestão de um alimento palatável ou após a administração de algum psicoestimulante, por exemplo (Baik, 2013b; Koob e Volkow, 2016). Os receptores do tipo D2R, por sua vez, possuem maior afinidade pela dopamina e são capazes de detectar níveis tônicos de liberação de dopamina, relacionados à liberação basal da mesma (Baik, 2013b). Os receptores do tipo D2R são responsáveis pela homeostase da neurotransmissão dopaminérgica, agindo tanto em nível pré-sináptico quanto pós-sináptico (Sim et al., 2013). Os receptores D2R localizados no terminal pré-sináptico

são chamados auto-receptores e regulam a atividade dopaminérgica por meio da diminuição da probabilidade de liberação de vesícula, inibindo sua síntese e liberação (Schmitz et al., 2001; Yorgason et al., 2013), desse modo, induzem uma retroalimentação negativa, reduzindo a liberação de DA e a excitabilidade neuronal (Baik, 2013a). Alterações na expressão dos receptores dopaminérgicos são responsáveis pela sensibilização locomotora a drogas como as anfetaminas (Shen et al., 2015). A diminuição da ativação do D2R no estriado também tem sido correlacionada com maior consumo de drogas (Murray et al., 2014) e de alimentos palatáveis (Baik, 2013a).

Berridge e colaboradores definiram os dois componentes principais relacionados ao consumo de alimento ou uso de drogas como o "gostar" (impacto hedônico) e o "querer" (motivação, incentivo) (Berridge, 1996, 2009; Berthoud et al., 2011). O "gostar" é essencialmente uma reação hedônica ao prazer de uma recompensa. O "querer", por outro lado, não está relacionado ao prazer, embora também seja um componente de recompensa, está mais relacionado com a motivação e com o comportamento de busca pela substância (Berridge, 2009). A liberação de dopamina contribui substancialmente para a saliência (o grau de relevância associado à representação de um estímulo) do incentivo, isto é, a parte do "querer" do processo, a busca pela substância, mais do que a parte do "gostar" (Rodrigues et al., 2011).

O "querer" é mediado em grande parte pelo sistema mesocorticolímbico, que envolve projeções de dopamina do mesencéfalo para alvos do prosencéfalo (Fig. 2) (Berridge e Robinson, 2016). A intensidade do impulso desencadeado em um indivíduo depende do estado em que os sistemas cerebrais relacionados à dopamina se encontram no momento da exposição à substância prazerosa. Em uma situação

de estresse, por exemplo, onde o sistema mesolímbico dopaminérgico está alterado, a saliência do incentivo pode ser maior, portanto aumentando a vulnerabilidade ao uso e à recaída de drogas (Berridge e Robinson, 2016).

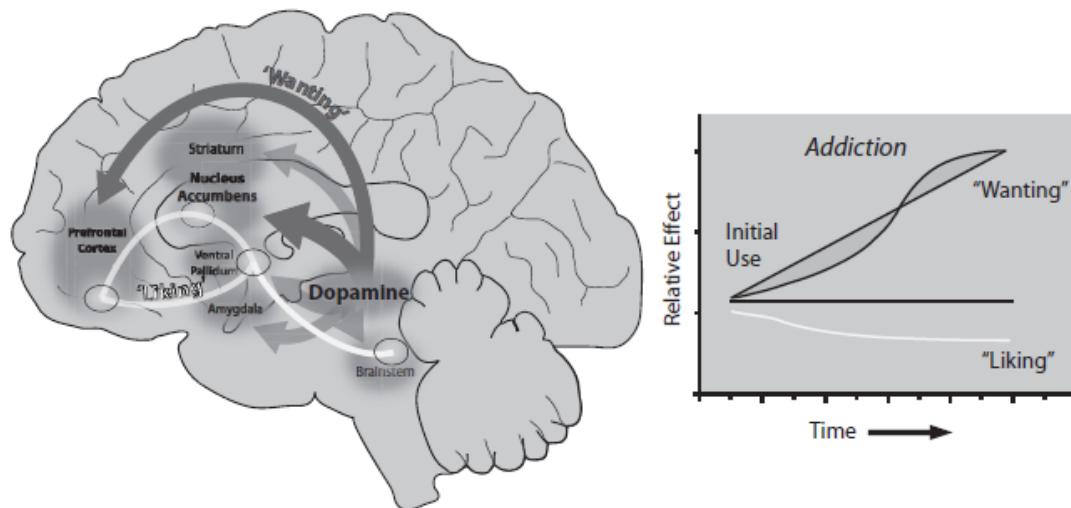


Fig. 2: Representação do sistema de recompensa mesocorticolímbico relacionado com os aspectos de “gostar” e “querer” dos comportamentos aditivos. À esquerda, representação das regiões encefálicas envolvidas com o “gostar” (linha branca) e com o “querer” (setas cinzas). À direita, a representação da teoria da adição mostra como o “querer” pode crescer ao longo do tempo independentemente do “gostar”, à medida que um indivíduo se torna dependente, por causa da sensibilização dos sistemas mesocorticolímbicos encefálicos. Fonte (Berridge e Robinson, 2016).

1.4.3 Mecanismo de ação dos psicoestimulantes

Uma das classes de drogas mais bem caracterizadas que produzem sensibilização comportamental em roedores é a classe dos psicoestimulantes do tipo anfetamina, tais como a anfetamina, a cocaína, o metilfenidato e a metanfetamina (Kalivas e Stewart, 1991). Essa classe de psicoestimulantes atua bloqueando a

recaptação e/ou promovendo a liberação de dopamina na fenda sináptica (Sulzer, 2011). A maior concentração de dopamina nos terminais dopaminérgicos no prosencéfalo que ocorre em consequência desta ação é responsável pelo aumento na atividade locomotora característica dos psicoestimulantes (Garcia-Mijares et al., 2009; Trainor, 2011). Estudos utilizando longos períodos de isolamento social observaram um aumento na liberação de dopamina e maior atividade locomotora em resposta à anfetamina (Fabricius et al., 2010; Yorgason et al., 2016).

A dietilpropiona (DEP) é um derivado de anfetamina que já foi utilizado em transtornos do apetite. Atualmente, sua comercialização está proibida por conta dos efeitos no sistema nervoso central. A DEP é um psicoestimulante de média potência e atua bloqueando a recaptação de dopamina através do transportador de dopamina (DAT) (Santamaria e Arias, 2010), além de estimular a liberação da mesma através do transporte reverso pelo DAT (Sulzer, 2011). Após a dopamina ser liberada na fenda sináptica, ela é metabolizada enzimaticamente ou por auto-oxidação, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Klegeris et al., 1995). Como consequência, essa liberação induz um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, por exemplo, a catalase, a glutationa-peroxidase e a superóxido dismutase (Teodorak et al., 2015).

O metilfenidato (MPH), da mesma forma, é um medicamento do tipo-anfetamina, e é utilizado atualmente no tratamento do déficit de atenção e hiperatividade. Contudo, o uso recreativo vem sendo registrado por conta dos seus efeitos psicoestimulantes (Clemow, 2015). Além disso, ele é extensamente utilizado em estudos pré-clínicos para avaliar a resposta à psicoestimulantes (Cummins et al., 2013; Volkow et al., 2011).

1.5 Estresse, adição e diferenças sexo-específicas

A literatura têm demonstrado que existem diferenças sexo-específicas em relação às respostas comportamentais e neurobiológicas ao estresse (Trainor, 2011) e à ingestão de alimento doce (Collins et al., 2015; Pankevich e Bale, 2008). Em ratos, as fêmeas geralmente apresentam maior preferência por alimentos ricos em açúcar e gordura como doces, chocolates, biscoitos, quando comparadas aos machos, e também apresentam maior sensibilidade ao estresse (Pankevich e Bale, 2008). Estudos em humanos observaram resultados semelhantes, mulheres costumam consumir mais alimentos palatáveis em situações de estresse, sendo o gênero um preditor de ingestão alimentar induzida por estresse, assim como ocorre nos roedores (Epel et al., 2001; Pankevich e Bale, 2008). Além disso, a prevalência de distúrbios alimentares associados ou não a comportamento aditivo é maior em mulheres (Pedram et al., 2013; Pursey et al., 2014).

Evidências apontam que existem diferenças sexo específicas também na aquisição e sensibilização a drogas. De um modo geral, as fêmeas são mais vulneráveis aos efeitos de recompensa que os machos (Collins et al., 2015). Estudos com humanos mostram que mulheres são mais vulneráveis ao abuso de drogas que homens (Bertholomey et al., 2016; Bobzean et al., 2014; Carroll e Anker, 2010; Elman et al., 2001). Da mesma maneira, estudos com roedores mostram que fêmeas são mais sensíveis aos efeitos reforçadores das drogas de abuso que machos (Anker e Carroll, 2011; Calipari et al., 2017; Carroll et al., 2004; Larson et al., 2005; Martinez et al., 2016; Nentwig et al., 2017). Westenbroek et al. (2013) verificaram que fêmeas isoladas apresentaram maior motivação para busca de cocaína que seus irmãos

machos. Além disso, fêmeas apresentam maior liberação de DA em resposta a um estressor na adolescência, o que pode ser um componente chave para a maior vulnerabilidade à sensibilização cruzada com drogas (Burke e Miczek, 2014). Ainda assim, a maioria dos estudos com isolamento social realizados até o momento utiliza machos como modelo animal (Burke et al., 2017).

1.6 Sensibilização cruzada: estresse & alimento palatável & uso de drogas

Todas as substâncias capazes de ativar o sistema dopaminérgico são passíveis de interação com outras que ativam as mesmas vias do sistema de recompensa. Este mecanismo é chamado de sensibilização cruzada (Burke e Miczek, 2014). Nesse sentido, diversos estudos já observaram, como descrito acima, que o estresse é capaz de estimular o consumo tanto de alimento palatável quanto de drogas (Adam e Epel, 2007; Burke e Miczek, 2014; Dallman et al., 2005; Garcia-Keller et al., 2013; Neisewander et al., 2012; Ulrich-Lai et al., 2016; Yorgason et al., 2016). Da mesma forma, mais recentemente tem sido observada sensibilização cruzada entre alimento palatável e uso de drogas (Avena e Gold, 2011; Gearhardt et al., 2011a; Nicolas et al., 2016). Animais sensibilizados para anfetamina consumiram mais sacarose e ao contrário, animais sensibilizados para sacarose apresentaram maior resposta locomotora à anfetamina (Avena et al., 2008). Além disso, já foi visto que indivíduos com diagnóstico de compulsão alimentar são mais propensos a consumir todos os tipos de substâncias aditivas, comparado com os controles (Ferriter e Ray, 2011). A literatura avaliando a sensibilização-cruzada entre estes três fatores em conjunto, porém, é quase inexistente.

2. JUSTIFICATIVA

A dependência de drogas, bem como os transtornos alimentares são graves problemas de saúde pública e causam prejuízos na qualidade de vida do indivíduo, problemas familiares, além de elevados custos sociais (Burke e Miczek, 2014; Rane et al., 2017). Apesar de serem problemas bem definidos e terem suas particularidades, estudos recentes têm mostrado que a dependência de drogas e os transtornos alimentares podem apresentar diversas características em comum e serem fatores de risco entre si (Avena et al., 2011; Davis et al., 2017). Um dos transtornos alimentares que apresenta uma série de características em comum com o uso de drogas é o transtorno da compulsão alimentar periódica, que por sua vez está intimamente relacionada com um comportamento alimentar do tipo-aditivo (*food addiction*) (Brewerton, 2017). Outro fator de risco envolvido tanto com o uso de drogas, quanto com transtornos alimentares é o estresse. O que estes três fatores (estresse, uso de drogas e compulsão alimentar) têm em comum é a ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico e, por este motivo, existe a possibilidade de ocorrer sensibilização cruzada entre eles (Baik, 2013b; Burke e Miczek, 2014). É importante ressaltar que mulheres são mais vulneráveis aos três fatores (Carroll e Anker, 2010; Pankevich e Bale, 2008).

A exposição a estressores, como o isolamento social, principalmente nas fases iniciais da vida pode alterar o sistema dopaminérgico em desenvolvimento e aumentar a vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos. Contudo, a maioria dos estudos utiliza longos períodos de isolamento social e pouco se sabe sobre os efeitos de um período curto de isolamento social sobre a programação do sistema de recompensa e a susceptibilidade a comportamentos aditivos na vida adulta.

Desse modo, considerando que (1) o isolamento social durante as fases iniciais da vida pode ser um estressor significativo e pode afetar o desenvolvimento do sistema de recompensa, facilitando a utilização de drogas de abuso e o consumo de alimentos palatáveis; (2) dietas ricas em sacarose (DRS) são bastante consumidas por crianças e adolescentes e por indivíduos em situações de estresse; (3) indivíduos do sexo feminino são mais susceptíveis a comportamentos aditivos e a distúrbios alimentares; (4) os efeitos a longo prazo da exposição a uma DRS em uma situação de estresse por isolamento social no início da vida sobre possíveis alterações no sistema de recompensa são desconhecidos; e (5) tendo em vista a possibilidade de sensibilização cruzada entre estes três fatores, a **hipótese** do presente estudo é que os animais expostos ao isolamento social num período sensível do desenvolvimento, como é o período pré-púbere, são mais susceptíveis a substâncias que ativem o sistema dopaminérgico, sendo portanto, mais propensos a comportamentos aditivos, tanto relacionados ao uso de drogas quando de alimento palatável. Além disso, a exposição a dieta palatável ao longo da vida pode interferir nesses aspectos do comportamento, aumentando a propensão ao consumo, ou de modo compensatório, aliviando os efeitos do estresse.

Cabe ressaltar que a compreensão de fatores preditores de comportamentos aditivos e a elucidação de possíveis mecanismos envolvidos é de extrema importância para a prevenção e tratamento dos mesmos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de um isolamento social de curta duração, durante o período pré-púbere, associado a uma dieta crônica rica em sacarose sobre a programação do sistema dopaminérgico e a vulnerabilidade a substâncias potencialmente aditivas em ratas Wistar adultas.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Analisar a resposta locomotora frente a um desafio com anfetamina e os parâmetros dopaminérgicos e de estresse oxidativo no estriado antes e após o desafio.
- 2) Avaliar o comportamento de busca por alimento doce (Froot Loops®) e os parâmetros dopaminérgicos basais no núcleo *accumbens*.
- 3) Investigar a intensidade de resposta à recompensa para metilfenidato através da preferência condicionada de lugar;
- 4) Analisar a transmissão sináptica excitatória nos neurônios espinhosos médios do NAc por meio do registro *in vitro* das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas na presença ou não de um agonista de receptor D1 de dopamina.

4. MATERIAS, MÉTODOS E RESULTADOS

Os materiais, métodos e resultados desta tese serão apresentados da seguinte forma:

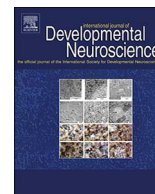
- *Capítulo I*: Artigo publicado na revista *International Journal of Developmental Neuroscience*.

- *Capítulo II*: Artigo submetido à revista *Behavioural Brain Research*

- *Capítulo III*: Resultados adicionais

4.1 CAPÍTULO I: *Short post-weaning social isolation induces long-term changes in the dopaminergic system and increases susceptibility to psychostimulants in female rats.*

Artigo publicado na revista *International Journal of Developmental Neuroscience*.



Short post-weaning social isolation induces long-term changes in the dopaminergic system and increases susceptibility to psychostimulants in female rats



Carine Lampert*, Danusa Mar Arcego, Natividade de Sá Couto-Pereira, Aline dos Santos Vieira, Ana Paula Toniazzo, Rachel Krolow, Emily Garcia, Deusa Aparecida Vendite, Maria Elisa Calcagnotto, Carla Dalmaz

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Early life stress
Early adolescence
High sugar diet
Amphetamine challenge
Dopaminergic system
Oxidative stress

ABSTRACT

Childhood and adolescence are sensitive periods of development, marked by high brain maturation and plasticity. Exposure to early life stress, such as social isolation, is able to prompt changes in sensitive brain circuitries, essentially in the mesolimbic dopaminergic system and increase the risk for addictive behaviors later in life. Post-weaning social isolation can stimulate the consumption of rewarding substances, like drugs of abuse and palatable foods. However, most studies analyze long periods of social isolation and very little is known about the effects of a brief social isolation in a sensitive period of development and its association with palatable food on the reward system sensitization. Furthermore, females are more susceptible to the reinforcing effect of drugs than males. Therefore, the aim of this study was to analyze the effects of a short post-weaning social isolation combined with a free access to a chronic high sugar diet (HSD) on the dopaminergic system, oxidative status and behavioral response to an amphetamine-like drug in adulthood. We used female Wistar rats that were socially isolated from post-natal days (PD) 21 to 35 and received free access to a HSD until PD 60. On PD 65, animals were submitted to a challenge with diethylpropion (DEP), an amphetamine-like drug and different responses were analyzed: locomotor activity, immunocontent of dopamine related proteins, and the oxidative status in the striatum, before and after the DEP challenge. We showed that a short post-weaning social isolation (SI) increased the locomotor response to DEP, when compared with previous saline administration. Social isolation also increased dopamine transporter, tyrosine hydroxylase, and decreased dopamine D2 receptor immunocontent. Additionally, SI increased the overall oxidative status parameters after the challenge with DEP. Interestingly, the exposure to a HSD prevented the SI effects on locomotor response, but did not interfere in the dopaminergic parameters evaluated, despite having modified some oxidative parameters. This study showed for the first time that a short post-weaning social isolation was able to induce long-term changes in the striatal dopaminergic system and increased the response to psychostimulants. These results emphasize the importance of stressful experiences during a short period of development on programming susceptibility to psychostimulants later in life.

1. Introduction

Childhood and adolescence are sensitive periods of neural maturation. These phases are marked by high plasticity of developing systems such as the dopaminergic system, which shows specific vulnerabilities to the effects of stress on the prefrontal cortex, striatal and limbic regions (Brydges et al., 2015; Oswald et al., 2014; Rodrigues et al., 2011; Spear, 2000; Tottenham and Galvan, 2016). Exposure to adverse

environmental conditions early in life is able to exert programming effects in sensitive circuitries and thereafter affect the risk of developing psychiatric disorders later in life (Davis et al., 2016; Doom et al., 2016; Matas et al., 2016; Schilling et al., 2007).

During childhood and adolescence, social interactions with peers are crucial for the emotional well-being of young mammals (Manduca et al., 2016; Vanderschuren et al., 2016), and deprivation of social interactions, particularly during these periods leads to several behavioral

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Porto Alegre/RS, CEP: 90035-003, Brazil.
E-mail address: carenl7@gmail.com (C. Lampert).

alterations that manifest in adulthood (Butler et al., 2016; Neisewander et al., 2012). Several evidences suggest that social isolation (SI) is associated with reward systems alterations and may affect the vulnerability to drug abuse (Brydges et al., 2015; Fareri and Tottenham, 2016; McCormick, 2010; Neisewander et al., 2012; Tottenham and Galvan, 2016). Studies have shown that post-weaning social isolation increases self-administration of several drugs, such as cocaine (Baarendse et al., 2014; Westenbroek et al., 2013), alcohol (Cortes-Patino et al., 2016; Kucher et al., 2016) and amphetamine (AMPH) (Stairs et al., 2011). However, most of these studies analyzed long periods of social isolation and relatively little is known about the effect of a short post-weaning social isolation.

Stressful conditions have also been associated with an increased motivation to consume palatable foods (rich in lipids and simple carbohydrates) as a way to relieve the effects of stress (Adam and Epel, 2007; Dallman et al., 2005; Epel et al., 2001; MacKay et al., 2014; Pecoraro et al., 2004). Moreover, children and adolescents are more prone to the intake of, and many times have easily access to industrialized high sugar foods, favoring the higher consumption of these reward substances (De Cosmi et al., 2017; Morin et al., 2017). On the other hand, in the last few years evidence emerged showing that high sugar foods can induce long-lasting changes in the function and sensitivity of dopaminergic system and can produce reward and craving comparable in magnitude to those induced by addictive drugs (Ahmed et al., 2013; Avena et al., 2008; Collins et al., 2015; Lenoir et al., 2007). Studies have demonstrated that the mesolimbic dopaminergic system could be susceptible to cross-sensitization between different substances that share the same neural network signaling. For example, individuals exposed to different stress conditions are more susceptible to consume drugs of abuse (Burke and Miczek, 2014; Garcia-Keller et al., 2013; Neisewander et al., 2012; Yorgason et al., 2016) or palatable foods (Adam and Epel, 2007; Dallman et al., 2005; Ulrich-Lai et al., 2016). Moreover, the extensive exposure to palatable foods also may induce a cross-sensitization with drugs of abuse and vice-versa (Avena and Gold, 2011; Gearhardt et al., 2011; Nicolas et al., 2016). However, there are almost no studies correlating this three factors: stress, palatable foods and drugs of abuse, which are currently particularly relevant in human societies, and there is little evidence about the specific neurobiological adaptations that contribute to the cross-sensitization between them (Karkhanis et al., 2016).

The mesolimbic dopaminergic system is the main system involved in reward processes and in sensitization to different kinds of substances (Murray et al., 2014; Rodrigues et al., 2011; Trainor, 2011). This system plays an important role in the reinforcing properties of natural rewards (Davis et al., 2008; Murray et al., 2014; Reichelt, 2016) and social play behavior (Manduca et al., 2016; Vanderschuren et al., 2016). It is also involved in the effects of drugs of abuse, which induce extracellular dopamine release in brain regions including the striatum, nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex (Matas et al., 2016). Studies using long periods of social isolation showed an increase in dopamine response and a significantly higher locomotor activity in response to AMPH (Fabricius et al., 2010). Dopaminergic receptors D1 (D1R) and D2 (D2R) contribute to the expression of behavioral sensitization and regulate the reward response (Shi and McGinty, 2011). They also play a significant regulatory role in the locomotor sensitization to drugs such as amphetamine (Shen et al., 2015). Diethylpropion (DEP), an amphetamine-like drug, is a mild psychostimulant and acts by blocking dopamine reuptake through the dopamine transporter (DAT) (Santamaria and Arias, 2010) and by inducing dopamine (DA) release via reversal of the transport mechanism (Sulzer, 2011). This enhanced dopaminergic activity increases locomotor behavior in rats (Garcia-Mijares et al., 2009; Trainor, 2011). After being released, DA is metabolized enzymatically or through autoxidation, resulting in production of reactive oxygen species (ROS) (Klegeris et al., 1995) and, which may induce an increase in antioxidant enzymes activity (Teodorak et al., 2015).

Studies have demonstrated that neurobiological and behavioral responses to stress (Trainor, 2011) and to sucrose intake (Collins et al., 2015) are frequently sex dependent. Women appear to be more vulnerable to drugs of abuse than men (Bertholomey et al., 2016; Bobzean et al., 2014; Carroll and Anker, 2010). Animal model studies have also evidenced that females are more susceptible to the reinforcing effect of drugs than males (Anker and Carroll, 2011; Calipari et al., 2017; Martinez et al., 2016; Nentwig et al., 2017). Westenbroek et al. (2013) evidenced that isolated females show higher motivation for cocaine seeking than their male counterparts, and a higher risk for escalation of drug use. In addition, females are more vulnerable to sucrose reward effect than males (Collins et al., 2015).

It is known that social isolation during childhood and adolescence seems to be significant stressful and affects the reward system development, possibly facilitating the drug addiction and natural rewards; that HSD is extensively used by children, adolescents and by individuals under stressing conditions; and that females are more susceptible to addiction than males. However, the long-term effect of combined exposure to a high sugar diet (HSD) in a social stress condition on the reward system is not clear. Taking altogether, the aim of this study was to evaluate the long-term effects of combined short post-weaning social isolation (PD 21–35) with chronic high sugar diet exposure, on the dopaminergic system and oxidative status in the striatum and the behavioral response to a psychostimulant in adult female rats. Our working hypothesis was that the exposure to social isolation in a critical period of development could change the dopaminergic system and increase the response to psychostimulants later in life, and a chronic HSD could affect this outcome.

2. Methods

2.1. Animals

Female Wistar rats ($n = 113$), on post-natal day (PD) 21 were housed in home cages made of Plexiglas ($65 \times 25 \times 15$ cm) with sawdust-covered floors and kept in a controlled environment 12 h dark/light cycle (lights on between 07:00 h and 19:00 h, temperature at 22 ± 2 °C, food and water provided). A total of 25 litters were used and a maximum of two animals per litter were assigned to each group. Half of the animals were group housed, 3–4 rats per cage (Control group), the other half were submitted to social isolation (SI – one animal in a smaller home cage, $27 \times 17 \times 12$ cm) (Douglas et al., 2004), from PD 21 to 35. Furthermore, the animals (Control or SI) were subdivided into 2 other groups, according to the available diet: (1) receiving standard lab chow only or (2) receiving both standard lab chow plus a high sugar diet (HSD) *ad libitum*. Therefore, it resulted in four experimental groups: (1) controls receiving standard chow (Control-Chow or CC); (2) controls receiving standard chow plus high-sugar diet (Control-HSD or CD); (3) Social isolated animals receiving standard chow (Isolated-Chow or IC); and (4) social isolated animals receiving standard chow plus HSD (Isolated-HSD or ID).

On PD 35, the SI animals were re-socialized, they returned to the regular home cages ($65 \times 25 \times 15$ cm) in groups of three or four. Animals received free access to standard chow and/or HSD until adulthood. The detail of nutritional composition of these diets is described in Table 1. The experimental model can be better understood in the timeline (Fig. 1A). All animal proceedings were performed in strict accordance to the recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences (SBNc) and Brazilian Law on the use of animals (Federal Law 11.794/2008), and were approved by the Institutional Ethical Committee (CEUA-UFRGS #25903). All efforts were made to minimize animal suffering, as well as to reduce the number of animals used.

2.2. Diet

The high-sugar diet used in this study was prepared in our lab. It

Table 1
Nutritional composition per 100 g of food used in this study.

Food	Energy (Kcal)	Total protein (g)	Total carbohydrate (g)	Total fat (g)
Standard Chow ^a	301.2	22	44.3 (from starch)	4
HSD ^b	346.3	27	40 (13,3 from starch and 26,7 from sucrose and lactose)	4.5

According to Arcego, D. M. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: Effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiology & Behavior* 124 (2014) 23–32.

^a Nuvilab[®].

^b HSD: High Sugar Diet.

was enriched with simple carbohydrates, made with condensed milk, sucrose, vitamins and a salt mix, powder standard lab chow, purified soy protein, soy oil, water, methionine and lysine. The nutritional content of this diet is similar to that of a standard lab chow, however the major carbohydrates in the palatable diet were sucrose (Table 1) (Arcego et al., 2014; Souza et al., 2007); in contrast, standard lab chow is composed by carbohydrates obtained mainly from starch.

2.3. Amphetamine-Induced locomotion

2.3.1. Drug

Diethylpropion (Medley[®]) was dissolved in saline (0.9% w/v NaCl), in a concentration of 10 mg/mL, and was injected intraperitoneally (i.p.) in a volume of 1 mL/kg, given a dose of 10 mg/Kg, based on its amphetamine-like psychomotor stimulant characteristic dose and according to other studies (Reimer et al., 1995; Silveira et al., 2013).

2.3.2. Experimental procedure

On PD 60 the HSD was withdrawn to avoid acute effects of this diet consumption during the behavioral analysis, and after five days animals were submitted to an AMPH locomotor challenge. On the first day of the experiment, rats were injected with 1 mL/kg saline (0.9% w/v NaCl). Immediately after the injection, they were kept in a neutral box

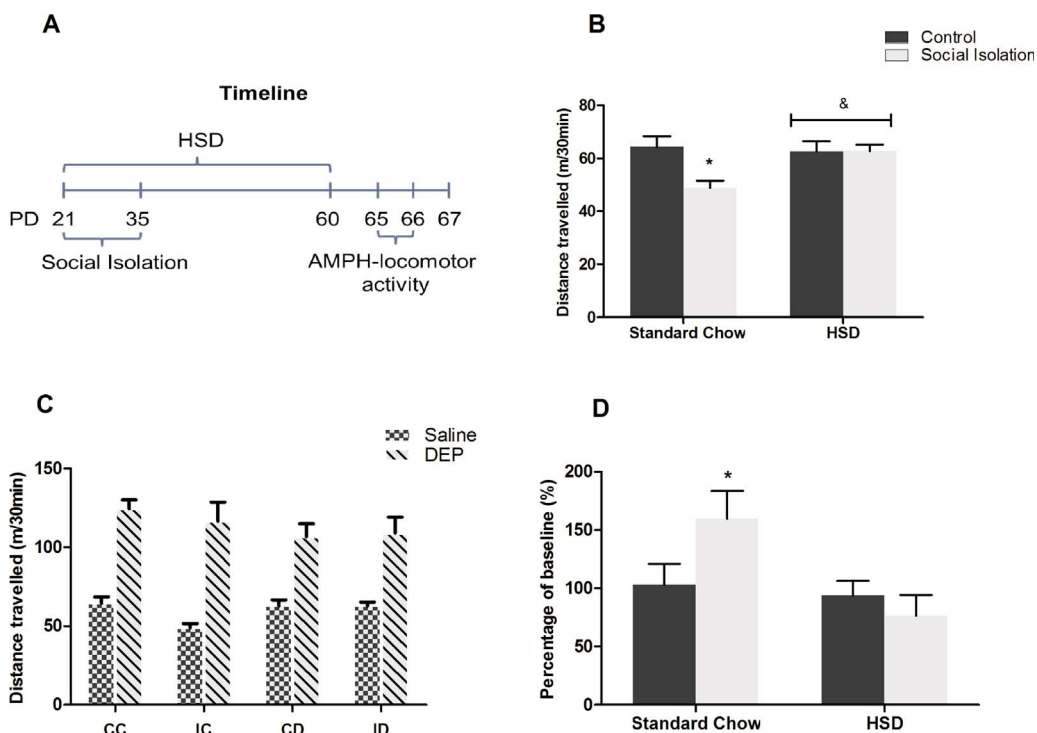


Fig. 1. Timeline and locomotor response to saline or DEP in animals subjected to a short post-weaning social isolation with or without exposure to a high sugar diet. Timeline (A). Distance travelled (m) during a 30 min open field after saline injection (B). Distance travelled (m) on open field after saline (checkered bars) and after DEP injections (crosshairs bars) (C). Percentage of baseline (%): represents the percent increase over individual baseline levels regarding the increase in distance travelled on open field after DEP administration, compared with previous saline administration (D). CC: Control-Chow; IC: Isolated-Chow; CD: Control-HSD and ID: Isolated-HSD; &: Interaction SI × HSD (Two-way ANOVA, $p = 0.025$). *Effect of SI, different from the other groups (Two-way ANOVA and Tukey *post-hoc* test, $p < 0.05$); $n = 9$ –11/group.

for 10 min. Then, rats were placed individually in a 50-cm high, 50 × 50-cm open field arena, that consist in a square black box, made of medium density fiberboard (MDF). The total distance travelled (m) was determined during 30 min using the software *AnyMaze[®] video tracking*. On the second day, rats were injected (i.p.) once with DEP (10 mg/kg, in a total volume of 1 mL/Kg), and the same parameters were analyzed (Silveira et al., 2013). The percent increase in locomotor activity after DEP challenge over individual baseline levels was considered.

2.4. Biochemical analysis

For the biochemical analysis, two sets of animals, that had previously received only saline, or DEP, were used. Twenty-four hour after the behavioral procedures, animals that previously received DEP or saline were quickly euthanized using a guillotine, between 1:00 p.m. to 4:00 p.m. Brains were removed and the dorsal striatum was quickly dissected out on ice and stored at -80°C until analysis. Half of samples were used for western blot analysis and the other half was designated to the determination of oxidative stress parameters.

2.4.1. Western blot

Dorsal striatum was homogenized in ice-cold lysis buffer pH 7.9: 10 mM KCl, 10 mM Hepes, 0.6 mM EDTA, 1% NP-40 and 1% protease inhibitor cocktail (Roche[®]). Electrophoresis was performed using equal protein concentrations (40 μg of total protein/lane, determined using a commercial kit BCA Protein Assay [Thermo Scientific, U.S.A]) onto NuPAGE[®] 4–12% Bis-Tris Gel. Proteins were transferred (XCell SureLock[®] Mini-Cell, Invitrogen) to nitrocellulose membranes (1 h 30 min at 50 V in transfer buffer [48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.25% SDS] (Valentim et al., 2001) and blots were then blocked for 2 h in Tris-buffered saline (T-TBS) with 5% m/v non-fat dry milk. After that, blots were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing one of the following antibodies: anti-D1 receptor (1:500, Millipore, produced in mouse), anti-D2 receptor (1:500; Millipore, produced in rabbit), anti-Dopamine Transporter (DAT, 1:500, Millipore, produced in rabbit), anti-Tyrosine Hydroxylase (TH, 1:2000, Millipore, produced in rabbit), and anti- β -actin (1:3500,

Millipore, produced in rabbit). Blots were then washed three times for 5 min with T-TBS and incubated for 2 h with secondary antibody in a solution containing peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000, Millipore) or anti-mouse IgG (1:1000, Cell Signaling). After 4 washes, blots were developed using a chemiluminescence Amersham™ ECL kit (GE Healthcare, UK). The chemiluminescence was detected using a digital imaging system (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences). The intensity of bands was quantified by densitometric analysis using the Image Studio Lite Software, v. 5.2. Results were expressed as the ratio of intensity of the protein of interest to that of anti- β -actin of the same sample in the same blot, and expressed in percentage of control.

2.4.2. Oxidative stress analysis

Dorsal striatum was homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold potassium phosphate buffer 50 mM (pH 7.4), containing 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 1000g for 10 min at 4 °C and the supernatant was used.

2.4.2.1. Superoxide dismutase activity: Superoxide dismutase activity was determined using a RANSOD® kit (#SD125, Randox Laboratories Ltd., UK) (Delmas-Beauvieux et al., 1995). This assay employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to form a formazan dye that is assayed spectrophotometrically at 492 nm at 37 °C. The inhibition of the production of the chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample; one unit of SOD causes 50% inhibition of the rate of reduction of INT under the conditions of the assay.

2.4.2.2. Glutathione peroxidase activity: Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined using the commercial kit RANSEL (#RS504, Randox Laboratories Ltd., UK), based on Paglia and Valentine method (Paglia and Valentine, 1967). GPx catalyzes the oxidation of Glutathione. In the presence of Glutathione Reductase and NADPH the oxidized Glutathione is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP⁺. The decrease in the known concentration of NADPH was monitored by spectrophotometry at 340 nm, 25 °C. The spontaneous NADPH oxidation was subtracted from the overall reaction ratio. GPx activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg protein.

2.4.2.3. Catalase activity: Catalase activity (CAT) was evaluated based on spectrophotometric establishment of the rate of H₂O₂ degradation at 240 nm at 25 °C (Aebi, 1984). CAT activity was calculated in micromoles of H₂O₂ consumed per minute per mg of protein, using a molar extinction coefficient of 43.6 M⁻¹ cm⁻¹.

2.4.2.4. Free radical production by chemical oxidation of dichlorodihydrofluorescein (DCFH): Samples were incubated with 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (100 μ M) at 37 °C for 30 min. DCFH-DA is hydrolyzed by cellular esterases and DCFH is released and posteriorly oxidized by reactive oxygen/nitrogen species. Using a spectrum photometer, the formation of the fluorescent derivative dichlorofluorescein (DCF) was monitored by excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively. The formation of oxidized reactive oxygen/nitrogen species was inferred from DCF production and quantified using a DCF standard curve and results were expressed as nmol of DCF formed per mg of protein (Sriram et al., 1997).

2.4.2.5. Total thiol content: This assay is based on the reduction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) by thiol groups, which become oxidized (disulfide), yielding a yellow compound (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery, 2001).

2.4.2.6. Protein assay: Protein concentration was determined using the method described by Lowry et al. (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as standard.

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM, and was analyzed using two-way ANOVA, with social isolation and HSD as factors or repeated-measures ANOVA when appropriate. ANOVA tests were followed by Tukey multiple range test to assess differences between groups when interactions were significant. Pearson correlation analysis was used to study the relationship between locomotor activity and biochemical results. All analyses were performed using IBM SPSS Statistic 22.0 software and significance level was set at $p < 0.05$ for all analyses.

3. Results

3.1. Social isolation induces a higher increase in locomotor activity after an AMPH injection

During the first exposure to the open field, after saline injection, an interaction SI \times HSD ($F[1,36] = 5.48, p = 0.025$) was observed regarding the total distance travelled. Rats exposed to social isolation early in life showed a reduced locomotor activity, particularly, SI animals that received only standard chow showed the lowest locomotor activity ($F[1,36] = 5.37, p = 0.026$; two-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc* test). However, this effect was not evidenced in animals that were offered a HSD: HSD prevented the effect of SI (Fig. 1B). Twenty-four hours after, when animals received DEP, repeated-measures showed all groups increased locomotor activity ($F[1,32] = 208.3, p = 0.0001$; two-way ANOVA) without differences between them in the performance after DEP administration (Fig. 1C). However, an interaction SI \times HSD was evidenced regarding the increase in locomotor activity after DEP challenge when compared to previous saline administration (Percentage of baseline%), and SI animals that received standard chow only, exhibited a higher increase in locomotor activity, compared with the others groups ($F[1,30] = 6.58, p = 0.016$, followed by Tukey *post-hoc* test, Fig. 1D). These results show that animals exposed to post-weaning social isolation increase the locomotor response to AMPH and the exposure to HSD prevents this effect.

3.2. Short post-weaning social isolation induces long-term changes in dopaminergic parameters

The increase in locomotor response to DEP in SI group suggests that these animals could be more responsive to a challenge with an AMPH, indicating possible changes in dopaminergic signalization. Therefore, we analyzed the immunocontent of dopamine receptors D1 (D1R) and D2 (D2R), the dopamine transporter (DAT) and the enzyme tyrosine hydroxylase (TH), a key enzyme of dopamine synthesis (Axelrod and Weinshilboum, 1972), in the dorsal striatum of all animals, in basal conditions and after a challenge with DEP. In basal conditions no differences were observed in any of the dopaminergic parameters analyzed (Fig. 2).

Animals that received a single dose of DEP were evaluated 24 h after its administration. Social isolation earlier in life led to a reduction in D2R immunocontent ($F[1,17] = 9.28, p = 0.007$), and an increase in DAT ($F[1,15] = 10.3, p = 0.006$) and TH ($F[1,18] = 6.11, p = 0.024$) immunocontent (Fig. 3B, C, D respectively). These results suggest that a short post-weaning social isolation is able to induce long-term changes in dopaminergic system and increase the response to psychostimulants.

3.3. Social isolation stimulates oxidative status in dorsal striatum

So far, our results had showed that a short period of social isolation after weaning induces an increase in locomotor activity and

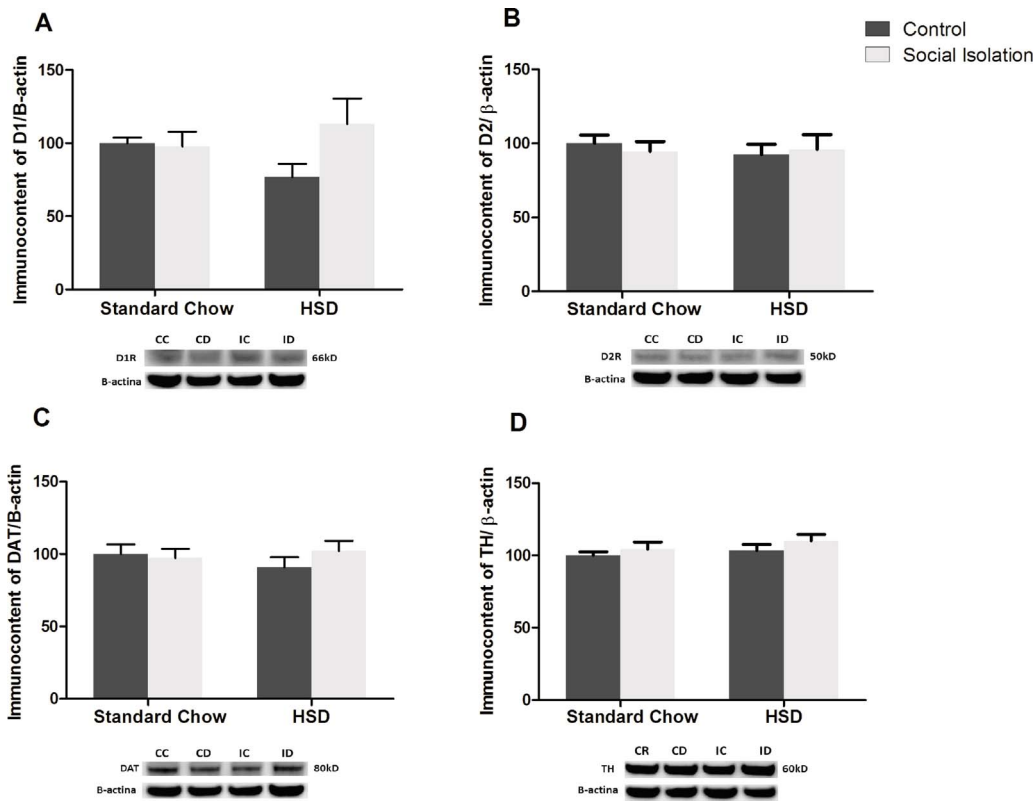


Fig. 2. Immunoccontent of dopaminergic parameters D1R (A), D2R (B), DAT (C) and TH (D), 24 h after saline administration in dorsal striatum of adult animals subjected to a short post-weaning social isolation, receiving or not a high sugar diet. CC: Control-Chow; CD: Control-HSD; IC: Isolated-Chow and ID: Isolated-HSD. No statistical differences was observed, $p > 0.05$, $n = 7$ /group.

dopaminergic activity AMPH-dependent. Considering that dopamine metabolism leads to the production of reactive oxygen species, we verified if a challenge with an AMPH-derivative drug could alter oxidative stress parameters in dorsal striatum. This evaluation was made in baseline conditions and 24 h after the challenge with DEP.

In baseline conditions, the activities of the antioxidant enzymes SOD ($F[1,19] = 10.46$, $p = 0.004$) and GPX ($F[1,20] = 5.19$, $p = 0.034$) were reduced in animal exposed to a high sugar diet, and an interaction $SI \times HSD$ in total thiol content ($F[1,20] = 5.54$, $p = 0.029$) was observed (Fig. 4A, B, D, respectively). Production of ROS and CAT

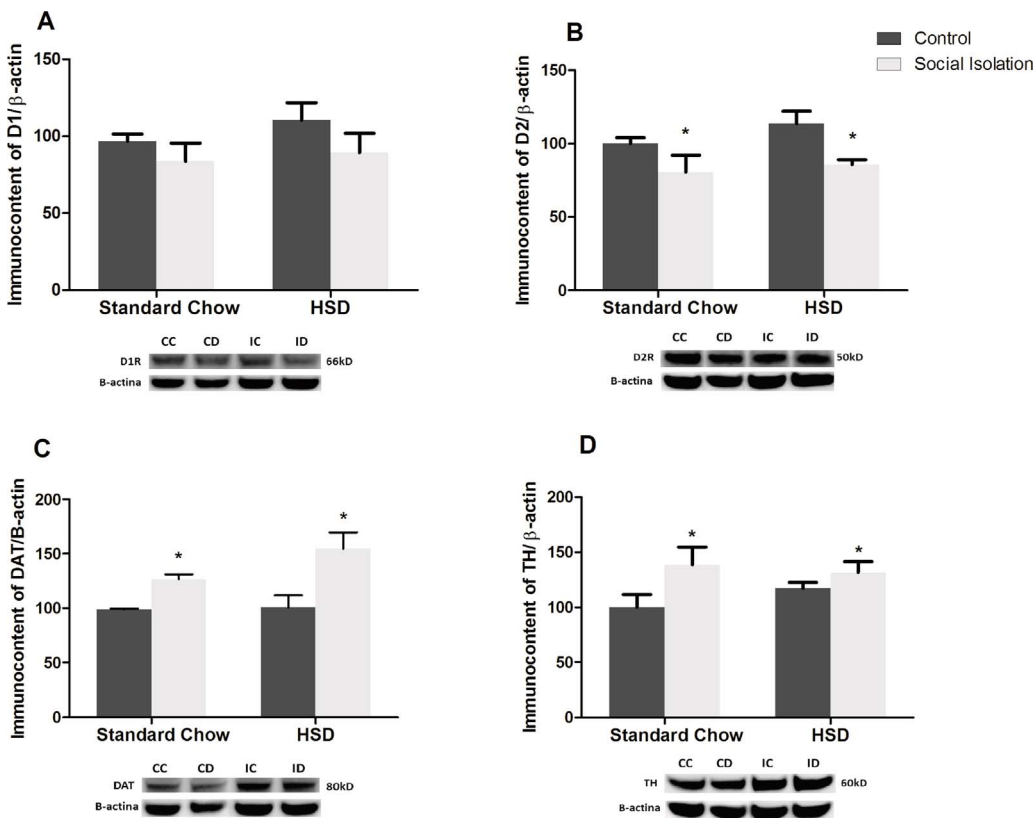


Fig. 3. Immunoccontent of D1R (A), D2R (B), DAT (C) and TH (D) 24 h after the DEP challenge in dorsal striatum of adult rats that were subjected to a short post-weaning social isolation, receiving or not a high sugar diet. CC: Control-Chow; CD: Control-HSD; IC: Isolated-Chow and ID: Isolated-HSD. *Effect of SI (Two-way ANOVA, $p < 0.05$), $n = 5$ /group.

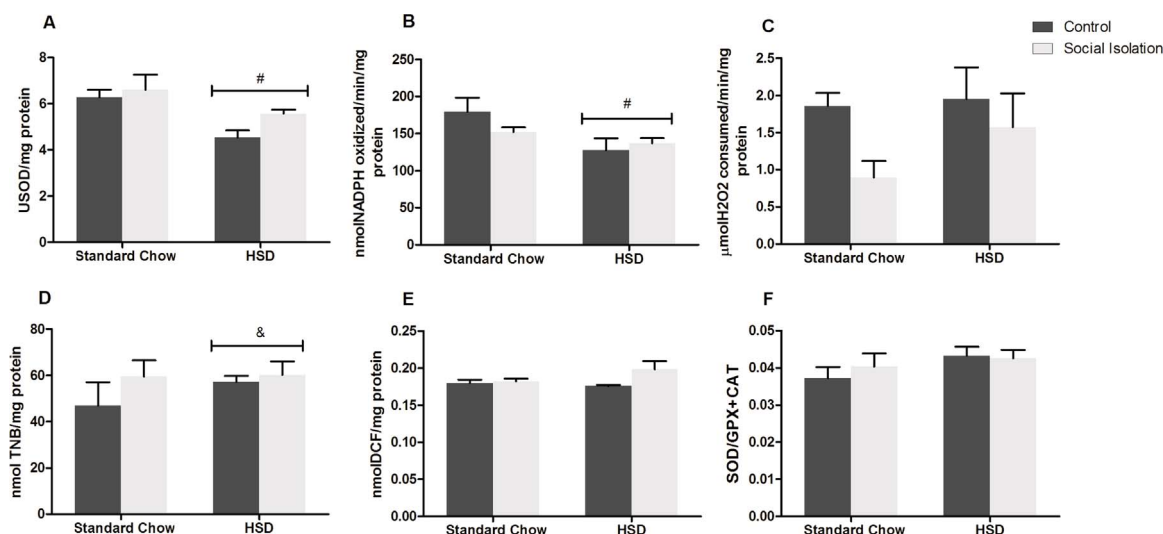


Fig. 4. Oxidative stress parameters in basal conditions in dorsal striatum of adult rats subjected to a short post-weaning social isolation, receiving or not a high sugar diet. Activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase – SOD (A), glutathione peroxidase-GPX (B), catalase-CAT (C), total thiols content (D), production of reactive oxygen species-ROS, evaluated through the diclorofluoresceine-DCF test (E) and the SOD/GPX + CAT ratio (F). #Effect of HSD; & Interaction SI × HSD; Two-way ANOVA, $p < 0.05$; $n = 7-9$ /group.

activity, as well as the SOD/GPX + CAT ratio was not different between groups (Fig. 4C, E, F).

A challenge with an AMPH would induce increased dopaminergic activity and, therefore, increased ROS production due to dopamine metabolism (Teodorak et al., 2015). In this study, after the DEP challenge, despite an overall increased production of ROS (see scale in the figures), animals exposed to social isolation early in life presented an increased production of ROS ($F[1,29] = 10.18$, $p = 0.003$) compared to the other groups, while exposure to HSD decreased this parameter ($F[1,29] = 8.87$, $p = 0.006$) (Fig. 5E). In addition, animals with increased distance travelled after DEP injection also presented higher ROS production (significant positive correlation between locomotor activity and ROS production Pearson correlation analysis, $r = 0.682$; $p = 0.021$; see Fig. 1 in supplementary material).

Moreover, SI also increased the activity of the antioxidant enzymes SOD ($F[1,28] = 41.18$, $p = 0.0001$), GPX ($F[1,26] = 51.01$, $p = 0.001$) and CAT ($F[1,23] = 7.83$, $p = 0.01$) (Fig. 5A, B, C), as well as the levels of total thiols ($F[1,25] = 17.65$, $p = 0.0001$) (Fig. 5D). The increase in SOD activity with SI exposure was higher in HSD

groups, but reaching similar values as the SI-chow group (Fig. 5A). Therefore, an interaction between SI and HSD was observed on SOD activity ($F[1,28] = 6.63$, $p = 0.016$). On the other hand, HSD access decreased CAT activity ($F[1,23] = 6.9$, $p = 0.015$), partially reverting SI effect on this enzyme activity (Fig. 5C). Similarly, the same occurred with ROS production (indicated by DCF technique), SI increasing the production of ROS ($F[1,29] = 10.18$, $p = 0.003$), while HFD access decreased it ($F[1,29] = 8.87$, $p = 0.006$) (Fig. 5E). Also, the exposure to HSD increased the SOD/GPX + CAT ratio ($F[1,15] = 6.31$, $p = 0.024$) (Fig. 5F). Therefore, these results show that the exposure to social isolation early in life makes the animals more susceptible to challenges with psychostimulants, including higher responses related to oxidative stress parameters, and the exposure to HSD modulates some of these parameters.

4. Discussion

In this study, we evidenced for the first time that a short social isolation during a specific period of development prompts long-term

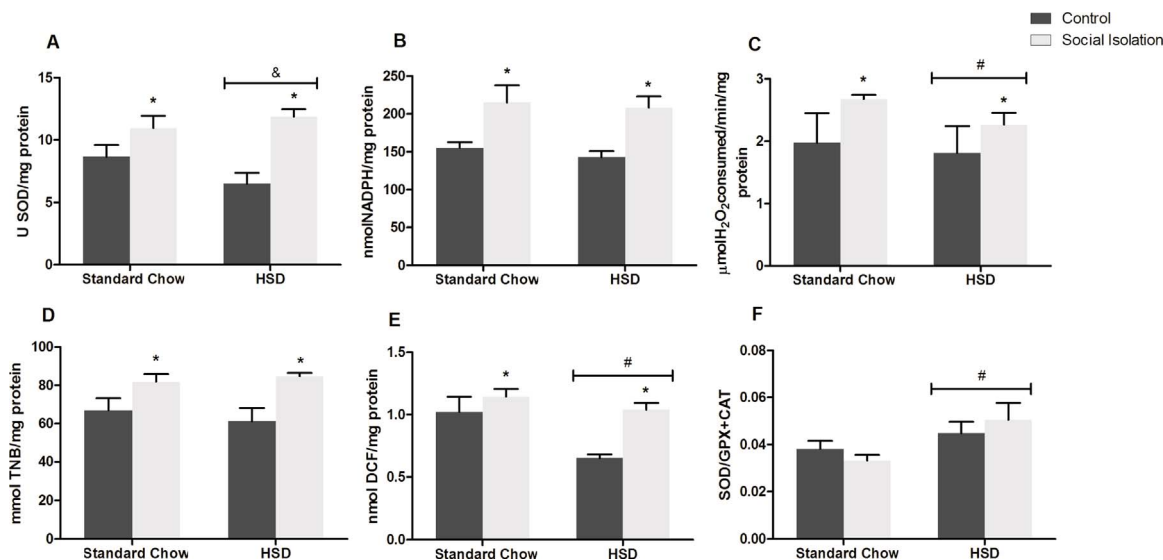


Fig. 5. Oxidative stress parameters, 24 h after DEP-challenge in dorsal striatum of adult rats that were subjected to a short post-weaning social isolation, receiving or not a high sugar diet. Activities of superoxide dismutase – SOD (A), glutathione peroxidase-GPX (B), catalase-CAT (C), total thiols content (D), production of reactive oxygen species-ROS, evaluated through the diclorofluoresceine-DCF test (E) and the SOD/GPX + CAT ratio (F). *Effect of SI; #Effect of HSD; & Interaction SI × HSD; Two-way ANOVA, $p < 0.05$; $n = 7-9$ /group.

effects on dopaminergic system, and enhances the response to psychostimulants in adulthood. We showed that SI increased the locomotor response to DEP, and changed dopaminergic parameters and oxidative status in striatum after an AMPH challenge, indicating a higher susceptibility of SI animals to psychostimulants. On the other hand, the free access to a chronic high sugar diet does not appear to sensitize the dopaminergic system, and it was able to prevent the behavioral effect induced by SI.

A short period of social isolation induced a long-term reduction in locomotor activity in the baseline, during the first exposure to the open field, whereas HSD prevented this effect. These results are in agreement with Arakawa (2003), that observed a reduced in number of crossings in SI animals (PD26-40) when analyzed shortly after isolation (Arakawa, 2003). Moreover, a few other studies that evaluated short periods of post-weaning social isolation (until 3 weeks of SI) observed no differences in locomotor activity (Ishihama et al., 2010; Lander et al., 2017; Lukkes et al., 2012; Paulus et al., 1998) compared with grouped animals. These findings are contrary to others studies that have reported an increase in locomotor activity in SI animals (Haupt and Schaefer, 2010; Hickey et al., 2012; Ko and Liu, 2015; Simpson et al., 2010; Varty et al., 2000), however, the majority of those studies analyzed long periods of social isolation (more than 6 weeks). One factor that could also influence locomotion would be the cage size, that has been shown to affect locomotion when juvenile, but not adult rats were tested (Arakawa, 2005). Since all our tests were performed during the adulthood and for several weeks the animals had similar stocking conditions, we believe that the early stress exposure was the responsible for the main effect in locomotor activity. Therefore, our findings corroborate with the hypothesis that different periods of social isolation induce distinct changes on behavior. Thus, while long periods of social isolation lead to increased locomotor activity, short periods may decrease or have no effect in this parameter. Additionally, exposure to a high sugar diet may prevent this SI effect, suggesting that the exposure to HSD during social isolation could counteract some of the stress effects.

After the challenge with DEP, SI animals showed a higher increase in locomotor activity when compared with the previous saline administration, reaching a level of activity similar to the other groups. Again, HSD prevented this effect. These results indicate that the short post-weaning social isolation induces an increase in response to a challenge with DEP. These findings are in agreement with other studies that evidenced increased locomotor activity AMPH-dependent in animals that were previous socially isolated (Herrmann et al., 2014; Lander et al., 2017; Lomanowska et al., 2010). A possible limitation in this experiment would be the possibility of a ceiling effect, as suggested by some authors (Cain et al., 2008; Mathews et al., 2010).

Despite this effect on locomotor activity after DEP challenge, social isolation was able to induce neurochemical alterations in dorsal striatum that were not counteracted by HSD. In this study, we evidenced an increase in DAT and TH and a reduction in D2R immunocenters after the DEP challenge, without alteration in D1R immunocenters. Given that TH, the rate-limiting enzyme in the synthesis of dopamine (Axelrod and Weinshilboum, 1972), was found increased, this findings suggest an increase in DA production (Trainor, 2011) and an overall increase in DA signalization in SI animals in response to DEP. Moreover, studies suggest that a higher DAT function in the striatum appears to increase the potency of AMPH or other drugs acting on uptake inhibition and this could lead to an increased dopamine signalization (Calipari et al., 2013; Yorgason et al., 2016). Our findings are in agreement with other studies that showed an increase in dopamine release and dopaminergic parameters in response to different psychostimulants in SI animals, although in those studies longer periods of isolation were used (usually from weaning to adulthood) (Hall et al., 1998; Trainor, 2011; Yorgason et al., 2016; Yorgason et al., 2013). In the present study we showed that these effects can be induced even by a short period of social isolation. The low levels of D2R immunocenters

observed in SI animals after DEP exposure could suggest a low inhibition of D2 receptor feedback signaling, since D2 auto-receptors regulate dopamine activity by decreasing vesicular release through inhibition of dopamine synthesis and its exocytosis (Schmitz et al., 2001; Yorgason et al., 2013) and are in agreement with other studies using SI (more than 4 weeks). Moreover, a reduced availability of dopamine D2 receptors in the striatum has been associated with increase in drug intake (Murray et al., 2014). A higher response to AMPH and an increase in DA release was also observed in clinical studies with individuals who experienced a high number of adverse events in childhood (Oswald et al., 2014).

On the other hand, there are divergent results in the literature concerning basal dopaminergic parameters after SI. In the present study no differences were observed in dopaminergic parameters in basal condition in dorsal striatum; changes were only observed after DEP challenge. These findings are in agreement with other studies that did not observe differences in DA release or dopaminergic markers in SI animals (> 6 weeks) in basal conditions, just after an ethanol injection (Karkhanis et al., 2014) or after an AMPH injection (Fabricius et al., 2011). In addition, no differences in DA release or DA turnover were found in SI animals (8–9 weeks) without any challenge (Wang et al., 2012). Together, the findings of the present study indicate that a short post-weaning social isolation appears to induce changes in the developing dopaminergic system in such a way as to induce enhanced responses to psychostimulants.

A possible increase in dopamine release would lead to increased ROS levels (Pomierny-Chamiolo et al., 2013). Moreover, the elevated dopamine levels and the production of ROS may lead to the induction of compensatory mechanisms, such as an increase in antioxidant enzymes activities (Pomierny-Chamiolo et al., 2013). In this study, we showed that socially isolated animals had increased oxidative status after a challenge with DEP, with a higher production of ROS, and compensatory increased antioxidant enzymes activities, whereas, the exposure to HSD induced a reduction in CAT activity and ROS production. In basal conditions, SI did not affect oxidative stress parameters in adult striatum, similar to the results observed above concerning dopaminergic parameters. Different reports are found in the literature relative to SI and the oxidative status: an increase in ROS production and a decrease in antioxidant enzyme activities (Arcego et al., 2013; Shao et al., 2015), or alterations in isolated parameters of oxidative stress (Krolow et al., 2013; Moller et al., 2011) have been observed. These distinct results could be due to differences in the duration of SI and the brain area studied, as well as the sex of the animals. Therefore, these data suggest that the challenge with DEP could induces a higher increase in dopamine release in the dorsal striatum of SI rats, a subsequent increase in ROS production and consequently a higher antioxidant enzymatic activity.

In the present study, we observed that the chronic exposure to HSD prevented some effects of SI, such as the increase in locomotor activity, but did not interfere in the effects of SI regarding dopaminergic parameters, before and after the DEP challenge. Here we have two facts: (1) The chronic exposure to HSD was not able to sensitize the dopaminergic system. It is possible that a different temporal pattern of availability would have a distinct outcome on the diet effects concerning the dopaminergic system (Fordahl et al., 2016). Accordingly, studies using intermittent access to high palatable food showed greater AMPH-locomotor response than those using a chronic availability (Avena et al., 2012; Fordahl et al., 2016). (2) HSD prevented the alterations in locomotor activity induced by SI. This finding is in agreement with the hypothesis that HSD acts as a “comfort food”, relieving the stress effects (Dallman et al., 2005; MacKay et al., 2014; Ulrich-Lai et al., 2016). The different HSD effects on SI animals concerning locomotor activity and dopaminergic parameters suggest that HSD could have distinct outcomes in different brain functions: for example, Ulrich-Lai et al. (2016) have observed that palatable foods are able to relieve some effects of stress, through the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)-dampening,

but it does not appear to act in a reward brain area, such as NAc. The way and local in the brain that HSD acts to counteract stress effects deserves further investigation.

Overall, the main changes induced by SI in the present study were observed after the challenge with DEP. These findings indicate that a short post-weaning social isolation can program brain circuits, such as the dopaminergic system, in a way that SI animals become more susceptible to psychostimulant substances. One possible mechanism related to these results is that social isolation during the early adolescence enhances the activation of HPA axis and increases levels of glucocorticoids (Toth et al., 2011) and corticotropin-releasing factor (CRF) (Lukkes et al., 2009). CRF is able to modulate DA neurons excitability in the VTA, thereby activating mesocorticolimbic neurotransmission and promoting drug use (Burke and Miczek, 2014; Mantsch et al., 2014). More studies are warranted to better understand the molecular changes that occur during the social isolation exposure in the brief period of early adolescence that seems to program the dopaminergic system, inducing long-term changes and increasing the susceptibility to psychostimulants.

5. Conclusion

This study showed for the first time that social isolation in a short and sensitive period of development, that is, childhood and early adolescence, induces long lasting changes in striatal dopaminergic system making animals more susceptible to psychostimulant actions in adulthood. A high sugar diet during the stress exposure is able to counterbalance the behavioral effects, although its action does not appear to involve the dopaminergic system. These results emphasize the importance that stressful experiences during development have on programming susceptibility to psychostimulants later in life. Understanding how early life stress affect the reward response to psychostimulants would help to identify at-risk youth for prevention efforts, as well as create interventions aiming to minimize propensity to drug abuse in adult life.

Funding

This work was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Brazil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Brazil.

References

Adam, T.C., Epel, E.S., 2007. Stress, eating and the reward system. *Physiol. Behav.* 91, 449–458.

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.

Ahmed, S.H., Guillem, K., Vandaele, Y., 2013. Sugar addiction: pushing the drug-sugar analogy to the limit. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16, 434–439.

Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302, 141–145.

Anker, J.J., Carroll, M.E., 2011. Females are more vulnerable to drug abuse than males: evidence from preclinical studies and the role of ovarian hormones. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 8, 73–96.

Arakawa, H., 2003. The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Dev. Psychobiol.* 43, 11–19.

Arakawa, H., 2005. Age dependent effects of space limitation and social tension on open-field behavior in male rats. *Physiol. Behav.* 84, 429–436.

Arcego, D.M., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Pettenuzzo, L.F., Marcolin, M.L., Toniazzo, A.P., Dalmaz, C., 2013. Stress during the pre-pubertal period leads to long-term diet-dependent changes in anxiety-like behavior and in oxidative stress parameters in male adult rats. *Neurochem. Res.* 38, 1791–1800.

Arcego, D.M., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Ferreira, A.G., Scherer, E., Wyse, A.T., Dalmaz, C., 2014. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiol. Behav.* 124, 23–32.

Avena, N.M., Gold, M.S., 2011. Sensitivity to alcohol in obese patients: a possible role for food addiction. *J. Am. Coll. Surg.* 451 (author reply 451–452).

Avena, N.M., Rada, P., Hoebel, B.G., 2008. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 20–39.

Avena, N.M., Gold, J.A., Kroll, C., Gold, M.S., 2012. Further developments in the neurobiology of food and addiction: update on the state of the science. *Nutrition* 28, 341–343.

Axelrod, J., Weinschilboum, R., 1972. Catecholamines. *N. Engl. J. Med.* 287, 237–242.

Baarendse, P.J., Limpens, J.H., Vanderschuren, L.J., 2014. Disrupted social development enhances the motivation for cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 1695–1704.

Bertholomey, M.L., Nagarajan, V., Torregrossa, M.M., 2016. Sex differences in reinstatement of alcohol seeking in response to cues and yohimbine in rats with and without a history of adolescent corticosterone exposure. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 2277–2287.

Bobzean, S.A., DeNobrega, A.K., Perrotti, L.I., 2014. Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Exp. Neurol.* 259, 64–74.

Brydges, N.M., Holmes, M.C., Harris, A.P., Cardinal, R.N., Hall, J., 2015. Early life stress produces compulsive-like, but not impulsive, behavior in females. *Behav. Neurosci.* 129, 300–308.

Burke, A.R., Miczek, K.A., 2014. Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 1557–1580.

Butler, T.R., Karkhanis, A.N., Jones, S.R., Weiner, J.L., 2016. Adolescent social isolation as a model of heightened vulnerability to comorbid alcoholism and anxiety disorders. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 1202–1214.

Cain, M.E., Denehy, E.D., Bardo, M.T., 2008. Individual differences in amphetamine self-administration: the role of the central nucleus of the amygdala. *Neuropsychopharmacology* 33, 1149–1161.

Calipari, E.S., Ferris, M.J., Salahpour, A., Caron, M.G., Jones, S.R., 2013. Methylphenidate amplifies the potency and reinforcing effects of amphetamines by increasing dopamine transporter expression. *Nat. Commun.* 4, 2720.

Calipari, E.S., Juarez, B., Morel, C., Walker, D.M., Cahill, M.E., Ribeiro, E., Roman-Ortiz, C., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Han, M.H., Nestler, E.J., 2017. Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. *Nat. Commun.* 8, 13877.

Carroll, M.E., Anker, J.J., 2010. Sex differences and ovarian hormones in animal models of drug dependence. *Horm. Behav.* 58, 44–56.

Collins, G.T., Chen, Y., Tschumi, C., Rush, E.L., Mensah, A., Koek, W., France, C.P., 2015. Effects of consuming a diet high in fat and/or sugar on the locomotor effects of acute and repeated cocaine in male and female C57BL/6J mice. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 23, 228–237.

Cortes-Patino, D.M., Serrano, C., Garcia-Mijares, M., 2016. Early social isolation increases persistence of alcohol-seeking behavior in alcohol-related contexts. *Behav. Pharmacol.* 27, 185–191.

Dallman, M.F., Pecoraro, N.C., la Fleur, S.E., 2005. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav. Immun.* 19, 275–280.

Davis, J.F., Tracy, A.L., Schurdak, J.D., Tschop, M.H., Lipton, J.W., Clegg, D.J., Benoit, S.C., 2008. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behav. Neurosci.* 122, 1257–1263.

Davis, J., Eyre, H., Jacka, F.N., Dodd, S., Dean, O., McEwen, S., Debnath, M., McGrath, J., Maes, M., Amminger, P., McGorry, P.D., Pantelis, C., Berk, M., 2016. A review of vulnerability and risks for schizophrenia: beyond the two hit hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 65, 185–194.

De Cosmi, V., Scaglioni, S., Agostoni, C., 2017. Early taste experiences and later food choices. *Nutrients* 9.

Delmas-Beauvieux, M.C., Peuchant, E., Dumon, M.F., Receveur, M.C., Le Bras, M., Clerc, M., 1995. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin. Biochem.* 28, 163–169.

Doom, J.R., Vanzomeran-Dohm, A.A., Simpson, J.A., 2016. Early unpredictability predicts increased adolescent externalizing behaviors and substance use: a life history perspective. *Dev. Psychopathol.* 28, 1505–1516.

Douglas, L.A., Varlinskaya, E.I., Spear, L.P., 2004. Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Dev. Psychobiol.* 45, 153–162.

Epel, E., Lapidus, R., McEwen, B., Brownell, K., 2001. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26, 37–49.

Fabricius, K., Helboe, L., Fink-Jensen, A., Wortwein, G., Steiniger-Brach, B., Sotty, F., 2010. Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study. *Neurosci. Lett.* 482, 117–122.

Fabricius, K., Steiniger-Brach, B., Helboe, L., Fink-Jensen, A., Wortwein, G., 2011. Socially isolated rats exhibit changes in dopamine homeostasis pertinent to schizophrenia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 347–350.

Fareri, D.S., Tottenham, N., 2016. Effects of early life stress on amygdala and striatal development. *Dev. Cogn. Neurosci.* 19, 233–247.

Fordahl, S.C., Locke, J.L., Jones, S.R., 2016. High fat diet augments amphetamine sensitization in mice: role of feeding pattern, obesity, and dopamine terminal changes. *Neuropharmacology* 109, 170–182.

Garcia-Keller, C., Martinez, S.A., Esparza, M.A., Bollati, F., Kalivas, P.W., Cancela, L.M., 2013. Cross-sensitization between cocaine and acute restraint stress is associated with sensitized dopamine but not glutamate release in the nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* 37, 982–995.

Garcia-Mijares, M., Bernardes, A.M., Silva, M.T., 2009. Diethylpropion produces psychostimulant and reward effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91, 621–628.

Gearhardt, A.N., Davis, C., Kuschner, R., Brownell, K.D., 2011. The addiction potential of hyperpalatable foods. *Curr. Drug Abuse Rev.* 4, 140–145.

Hall, F.S., Wilkinson, L.S., Humby, T., Inglis, W., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Robbins, T.W., 1998. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal

- dopaminergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59, 859–872.
- Haupt, M., Schaefers, A.T., 2010. Effects of postweaning social and physical deprivation on locomotor activity patterns and explorative behavior in female CD-1 mice. *Dev. Psychobiol.* 52, 383–393.
- Herrmann, A.P., Benvenuti, R., Pilz, L.K., Elisabethsky, E., 2014. N-acetylcysteine prevents increased amphetamine sensitivity in social isolation-reared mice. *Schizophr. Res.* 155, 109–111.
- Hickey, A.J., Reynolds, J.N., Beninger, R.J., 2012. Post-weaning social isolation and subchronic NMDA glutamate receptor blockade: effects on locomotor activity and GABA signaling in the rat suggest independent mechanisms. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101, 231–238.
- Ishihama, T., Ago, Y., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., Takuma, K., Matsuda, T., 2010. Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioral abnormalities in adult PACAP-deficient mice. *Behav. Brain Res.* 209, 274–280.
- Karkhanis, A.N., Locke, J.L., McCool, B.A., Weiner, J.L., Jones, S.R., 2014. Social isolation rearing increases nucleus accumbens dopamine and norepinephrine responses to acute ethanol in adulthood. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 38, 2770–2779.
- Karkhanis, A.N., Rose, J.H., Weiner, J.L., Jones, S.R., 2016. Early-life social isolation stress increases kappa opioid receptor responsiveness and downregulates the dopamine system. *Neuropsychopharmacology* 41, 2263–2274.
- Klegeris, A., Korkina, L.G., Greenfield, S.A., 1995. Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 215–222.
- Ko, C.Y., Liu, Y.P., 2015. Isolation rearing impaired sensorimotor gating but increased pro-inflammatory cytokines and disrupted metabolic parameters in both sexes of rats. *Psychoneuroendocrinology* 55, 173–183.
- Krolow, R., Noschang, C., Arcego, D.M., Pettenuzzo, L.F., Weis, S.N., Marcolin, M.L., Huffell, A.P., Mota, C.S., Dalmaz, C., 2013. Isolation stress exposure and consumption of palatable diet during the prepubertal period leads to cellular changes in the hippocampus. *Neurochem. Res.* 38, 262–272.
- Kucher, E.O., Egorov, A.Y., Chernikova, N.A., 2016. Early social isolation increases alcohol preference in experiment. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S.S. Korsakova* 116, 52–57.
- Lander, S.S., Linder-Shacham, D., Gaisler-Salomon, I., 2017. Differential effects of social isolation in adolescent and adult mice on behavior and cortical gene expression. *Behav. Brain Res.* 316, 245–254.
- Lenoir, M., Serre, F., Cantin, L., Ahmed, S.H., 2007. Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS One* 2, e698.
- Lomanowska, A.M., Ammari, N., Kraemer, G.W., 2010. Interactions between the effects of early isolation rearing and complex housing on adult locomotor activity and sensitivity to amphetamine in rats involve noradrenergic neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 100–105.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lukkes, J.L., Summers, C.H., Scholl, J.L., Renner, K.J., Forster, G.L., 2009. Early life social isolation alters corticotropin-releasing factor responses in adult rats. *Neuroscience* 158, 845–855.
- Lukkes, J.L., Engelman, G.H., Zelin, N.S., Hale, M.W., Lowry, C.A., 2012. Post-weaning social isolation of female rats, anxiety-related behavior, and serotonergic systems. *Brain Res.* 1443, 1–17.
- MacKay, J.C., James, J.S., Cayer, C., Kent, P., Anisman, H., Merali, Z., 2014. Protracted effects of juvenile stressor exposure are mitigated by access to palatable food. *PLoS One* 9, e96573.
- Manduca, A., Servadio, M., Damsteegt, R., Campolongo, P., Vanderschuren, L.J., Trezza, V., 2016. Dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens modulates social play behavior in rats. *Neuropsychopharmacology* 41, 2215–2223.
- Mantsch, J.R., Vranjkovic, O., Twining, R.C., Gasser, P.J., McReynolds, J.R., Blacktop, J.M., 2014. Neurobiological mechanisms that contribute to stress-related cocaine use. *Neuropharmacology* 76, 383–394 Pt B.
- Martinez, L.A., Gross, K.S., Himmler, B.T., Emmitt, N.L., Peterson, B.M., Zlebnik, N.E., Foster Olive, M., Carroll, M.E., Meisel, R.L., Mermelstein, P.G., 2016. Estradiol facilitation of cocaine self-administration in female rats requires activation of mGluR5. *eNeuro* 3.
- Matas, E., Bock, J., Braun, K., 2016. The impact of parent-infant interaction on epigenetic plasticity mediating synaptic adaptations in the infant brain. *Psychopathology* 49, 201–210.
- Mathews, I.Z., Morrissey, M.D., McCormick, C.M., 2010. Individual differences in activity predict locomotor activity and conditioned place preference to amphetamine in both adolescent and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 63–71.
- McCormick, C.M., 2010. An animal model of social instability stress in adolescence and risk for drugs of abuse. *Physiol. Behav.* 99, 194–203.
- Moller, M., Du Preez, J.L., Emsley, R., Harvey, B.H., 2011. Isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating and social interaction in rats are related to corticostriatal oxidative stress, and reversed by sub-chronic clozapine administration. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, 471–483.
- Morin, J.P., Rodriguez-Duran, L.F., Guzman-Ramos, K., Perez-Cruz, C., Ferreira, G., Diaz-Cintra, S., Pacheco-Lopez, G., 2017. Palatable hyper-caloric foods impact on neuronal plasticity. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 19.
- Murray, S., Tulloch, A., Gold, M.S., Avena, N.M., 2014. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 540–552.
- Neisewander, J.L., Peartree, N.A., Pentkowski, N.S., 2012. Emotional valence and context of social influences on drug abuse-related behavior in animal models of social stress and prosocial interaction. *Psychopharmacology (Berl)* 224, 33–56.
- Nentwig, T.B., Myers, K.P., Grisel, J.E., 2017. Initial subjective reward to alcohol in Sprague-Dawley rats. *Alcohol* 58, 19–22.
- Nicolas, C., Lafay-Chebassier, C., Solinas, M., 2016. Exposure to sucrose during periods of withdrawal does not reduce cocaine-seeking behavior in rats. *Sci. Rep.* 6, 23272.
- Oswald, L.M., Wand, G.S., Kuwabara, H., Wong, D.F., Zhu, S., Brasic, J.R., 2014. History of childhood adversity is positively associated with ventral striatal dopamine responses to amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 2417–2433.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Paulus, M.P., Bakshi, V.P., Geyer, M.A., 1998. Isolation rearing affects sequential organization of motor behavior in post-pubertal but not pre-pubertal Lister and Sprague-Dawley rats. *Behav. Brain Res.* 94, 271–280.
- Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, M.F., 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145, 3754–3762.
- Pomierny-Chamiol, L., Moniczewski, A., Wydra, K., Suder, A., Filip, M., 2013. Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. *Neurotox. Res.* 23, 92–102.
- Reichelt, A.C., 2016. Adolescent maturational transitions in the prefrontal cortex and dopamine signaling as a risk factor for the development of obesity and high fat/high sugar diet induced cognitive deficits. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 189.
- Reimer, A.R., Martin-Iverson, M.T., Urichuk, L.J., Coutts, R.T., Byrne, A., 1995. Conditioned place preferences, conditioned locomotion, and behavioral sensitization occur in rats treated with diethylpropion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51, 89–96.
- Rodrigues, A.J., Leao, P., Carvalho, M., Almeida, O.F., Sousa, N., 2011. Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 107–120.
- Santamaria, A., Arias, H.R., 2010. Neurochemical and behavioral effects elicited by bupropion and diethylpropion in rats. *Behav. Brain Res.* 211, 132–139.
- Schilling, E.A., Aeltner Jr., R.H., Gore, S., 2007. Adverse childhood experiences and mental health in young adults: a longitudinal survey. *BMC Public Health* 7, 30.
- Schmitz, Y., Lee, C.J., Schmauss, C., Gonon, F., Sulzer, D., 2001. Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *J. Neurosci.* 21, 5916–5924.
- Shao, Y., Yan, G., Xuan, Y., Peng, H., Huang, Q.J., Wu, R., Xu, H., 2015. Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus. *Behav. Brain Res.* 282, 201–208.
- Shen, M.Y., Perreault, M.L., Fan, T., George, S.R., 2015. The dopamine D1-D2 receptor heteromer exerts a tonic inhibitory effect on the expression of amphetamine-induced locomotor sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 128, 33–40.
- Shi, X., McGinty, J.F., 2011. D1 and D2 dopamine receptors differentially mediate the activation of phosphoproteins in the striatum of amphetamine-sensitized rats. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 653–663.
- Silveira, P.P., Benetti Cda, S., Portella, A.K., Diehl, L.A., Molle, R.D., Lucion, A.B., Dalmaz, C., 2013. Brief daily postpartum separations from the litter alter dam response to psychostimulants and to stress. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 426–432.
- Simpson, S.M., Menard, J.L., Reynolds, J.N., Beninger, R.J., 2010. Post-weaning social isolation increases activity in a novel environment but decreases defensive burying and subchronic MK-801 enhances the activity but not the burying effect in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 72–79.
- Souza, C.G., Moreira, J.D., Siqueira, I.R., Pereira, A.G., Rieger, D.K., Souza, D.O., Souza, T.M., Portela, L.V., Perry, M.L., 2007. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sci.* 81, 198–203.
- Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417–463.
- Sriram, K., Pai, K.S., Boyd, M.R., Ravindranath, V., 1997. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res.* 749, 44–52.
- Stairs, D.J., Prendergast, M.A., Bardo, M.T., 2011. Environmental-induced differences in corticosterone and glucocorticoid receptor blockade of amphetamine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 218, 293–301.
- Sulzer, D., 2011. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69, 628–649.
- Teodorak, B.P., Ferreira, G.K., Scaini, G., Wessler, L.B., Heylmann, A.S., Deroza, P., Valvassori, S.S., Zugno, A.L., Quevedo, J., Streck, E.L., 2015. Acute administration of fenproporex increased acetylcholinesterase activity in brain of young rats. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87, 1389–1395.
- Toth, M., Mikics, E., Tulogdi, A., Aliczki, M., Haller, J., 2011. Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. *Horm. Behav.* 60, 28–36.
- Tottenham, N., Galvan, A., 2016. Stress and the adolescent brain: amygdala-prefrontal cortex circuitry and ventral striatum as developmental targets. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 70, 217–227.
- Trainor, B.C., 2011. Stress responses and the mesolimbic dopamine system: social contexts and sex differences. *Horm. Behav.* 60, 457–469.
- Ulrich-Lai, Y.M., Christiansen, A.M., Wang, X., Song, S., Herman, J.P., 2016. Statistical modeling implicates neuroanatomical circuit mediating stress relief by ‘comfort’ food. *Brain Struct. Funct.* 221, 3141–3156.
- Valentim, L.M., Geyer, A.B., Tavares, A., Cimarosti, H., Worm, P.V., Rodnight, R., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2001. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunofluorescence and phosphorylation in rat hippocampus. *Neuroscience* 107, 43–49.
- Vanderschuren, L.J., Achterberg, E.J., Trezza, V., 2016. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 70, 86–105.
- Varty, G.B., Paulus, M.P., Braff, D.L., Geyer, M.A., 2000. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol. Psychiatry* 47, 864–873.
- Wang, Y.C., Ho, U.C., Ko, M.C., Liao, C.C., Lee, L.J., 2012. Differential neuronal changes

- in medial prefrontal cortex, basolateral amygdala and nucleus accumbens after postweaning social isolation. *Brain Struct. Funct.* 217, 337–351.
- Westenbroek, C., Perry, A.N., Becker, J.B., 2013. Pair housing differentially affects motivation to self-administer cocaine in male and female rats. *Behav. Brain Res.* 252, 68–71.
- Yorgason, J.T., Calipari, E.S., Ferris, M.J., Karkhanis, A.N., Fordahl, S.C., Weiner, J.L., Jones, S.R., 2016. Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum. *Neuropharmacology* 101, 471–479.
- Yorgason, J.T., Espana, R.A., Konstantopoulos, J.K., Weiner, J.L., Jones, S.R., 2013. Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1022–1031.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a analisar os efeitos de um isolamento social curto em um período de alta plasticidade neural, onde alguns sistemas encefálicos ainda estão em desenvolvimento, e de que forma a exposição a este isolamento associado a uma dieta rica em sacarose crônica pode afetar parâmetros relacionados ao sistema mesolímbico dopaminérgico e alterar a vulnerabilidade à comportamentos aditivos a longo prazo.

Neste contexto, foram avaliados dois aspectos diferenciados (o isolamento social e a dieta palatável) que podem afetar isoladamente o sistema dopaminérgico em desenvolvimento, mas também podem interagir entre si e gerar uma programação encefálica diferente, bem como, resultar em comportamentos específicos de acordo com cada exposição ou na junção de ambos os fatores. Então, por um lado foi avaliada a possibilidade de um estressor, como o isolamento social, de estimular a resposta locomotora a um psicoestimulante e incentivar o consumo de alimento palatável de maneira compulsiva/aditiva. E por outro lado, foi avaliado de que maneira a exposição a uma dieta rica em sacarose é capaz de alterar/neutralizar os efeitos do estresse e até que ponto ela por si só é capaz de ser um fator programador do sistema de recompensa e interferir nas respostas a psicoestimulantes e a alimento doce.

O primeiro resultado obtido, como observado no capítulo 1, mostra que o isolamento social no período pré-púbere é capaz de alterar a resposta locomotora a um psicoestimulante e alterar os parâmetros dopaminérgicos e oxidativos em resposta a um desafio com um derivado de anfetamina (a dietilpropiona).

A avaliação da resposta locomotora é importante, pois é um indicativo de sensibilização comportamental a alguma substância (Avena et al., 2008), no caso do presente trabalho, a resposta a um psicoestimulante. Em condições basais o

isolamento social causou uma redução da atividade locomotora no campo aberto e a DRS preveniu este efeito. Apesar de uma das características bem determinadas do isolamento social ser a hiperatividade locomotora, é importante ter em conta a duração da intervenção. A maior parte dos estudos com isolamento social utiliza longos períodos de intervenção (mais de 6 semanas), e grande parte destes estudos observaram maior atividade locomotora basal nos animais IS (Haupt e Schaefers, 2010; Hickey et al., 2012; Ko e Liu, 2015; Simpson et al., 2010; Varty et al., 2000). Por outro lado, os poucos estudos que utilizam isolamento social curto (até 3 semanas após o desmame) verificaram ausência de efeito (Ishihama et al., 2010; Lander et al., 2017; Lukkes et al., 2012; Paulus et al., 1998), comparado com os animais agrupados, ou redução da atividade locomotora (Arakawa, 2003), o que vai de encontro com os achados do presente estudo. Arakawa (2003) observou uma redução no número de cruzamentos na tarefa do campo aberto nos animais IS (PN26-40), quando analisados logo após o isolamento. Portanto, nossos achados corroboram com a hipótese de que diferentes períodos de IS induzem distintas mudanças comportamentais. Desse modo, enquanto que longos períodos de IS levam a um aumento na atividade locomotora, períodos curtos de isolamento diminuem ou não afetam este parâmetro. Além disso, a exposição à DRS preveniu a redução da atividade locomotora nos animais IS, sugerindo que a exposição a DRS durante o IS pode contrabalançar alguns efeitos do estresse.

Após a administração do psicoestimulante (a dietilpropiona), os mesmos animais que haviam apresentado redução da atividade locomotora basal, agora mostraram aumento da atividade locomotora, de forma a atingir níveis semelhantes aos demais grupos, sendo, portanto, maior a atividade locomotora em resposta à DEP nos animais

IS. Este resultado vai de encontro aos achados da literatura que, da mesma forma, evidenciaram maior atividade locomotora em resposta a diferentes psicoestimulantes em animais submetidos ao IS (Herrmann et al., 2014; Lander et al., 2017; Lomanowska et al., 2010).

O aumento na atividade locomotora observada após a exposição a um psicoestimulante é causada pela ativação da via mesolímbica dopaminérgica, que no caso dos animais IS parece estar sensibilizada (Fabricius et al., 2010; Vanderschuren e Kalivas, 2000; Yoon et al., 2016). Neste contexto, os mesmos animais IS que apresentaram maior atividade locomotora após o desafio com DEP, apresentaram, também, aumento nos parâmetros dopaminérgicos e no status oxidativo no estriado dorsal após uma única administração de DEP. Foi evidenciado que os animais que passaram pelo IS apresentaram um aumento no imunoconteúdo de DAT, de TH e uma redução nos níveis de D2R após o desafio com DEP, sem alterações no imunoconteúdo de D1R. Diversos estudos mostram que a ausência/diminuição de D2R está relacionada a uma maior sensibilização comportamental e consumo de drogas (Bello et al., 2011; Heinsbroek et al., 2017; Kai et al., 2015; Zhu et al., 2016), enquanto que o receptor D1 parece não ser necessário para a expressão da sensibilização comportamental (Vanderschuren e Kalivas, 2000). Bello e colaboradores (2011) mostraram que animais nocautes para D2R apresentaram maior produção e liberação de dopamina e foram mais sensíveis aos efeitos psicomotores da cocaína, indicando um papel importante dos receptores D2R na expressão e sensibilização a psicoestimulantes. No presente estudo, paralelamente à diminuição do D2R, o aumento no imunoconteúdo da TH, enzima chave na síntese de dopamina, bem como o aumento no transportador de dopamina - DAT após o desafio com a DEP

sugerem um aumento na sinalização dopaminérgica e possivelmente maior produção e liberação de dopamina (Trainor, 2011) nos animais que passaram pelo IS no período pré-púbere. Estudos sugerem que uma função aumentada no DAT no estriado parece aumentar a potência de anfetaminas e outras drogas que atuam na inibição da recaptação de dopamina, de modo que isso poderia levar a uma maior sinalização dopaminérgica (Calipari et al., 2013; Yorgason et al., 2016). Yorgason e colaboradores (2016) observaram, após um longo período de IS, um aumento no imunocontéudo do transportador de dopamina (DAT) e um aumento na liberação de dopamina no estriado. Outros estudos, utilizando longos períodos de IS observaram um aumento na liberação de dopamina e nos parâmetros dopaminérgicos em resposta a diferentes psicoestimulantes (Hall et al., 1998; Trainor, 2011; Yorgason et al., 2016; Yorgason et al., 2013). Diferentemente, no presente estudo observamos que a exposição a um curto período de IS no início da vida é capaz de induzir alterações duradouras no sistema dopaminérgico e aumentar a vulnerabilidade a psicoestimulante, uma vez que tais alterações se fazem presentes na vida adulta do animal. Por outro lado, o acesso livre e crônico a uma dieta rica em sacarose não foi capaz de sensibilizar o sistema dopaminérgico e preveniu o efeito do IS sobre a atividade locomotora, também após o desafio com a DEP.

A literatura acerca dos parâmetros dopaminérgicos basais após IS é divergente. No presente estudo não foram observadas alterações em quaisquer dos parâmetros analisados em condições basais, apenas após o desafio com a DEP. Esses achados estão de acordo com outros estudos que utilizaram IS (mais de 6 semanas), e da mesma forma não observaram alterações nos parâmetros dopaminérgicos após o IS, apenas após uma administração de etanol (Karkhanis et al., 2014) ou após uma

injeção de anfetamina (Fabricius et al., 2011). Além disso, outro estudo não observou diferença na liberação de DA ou no *turnover* de DA nos animais IS (8-9 semanas) quando na ausência de qualquer desafio (Wang et al., 2012).

A liberação aumentada de dopamina induz um aumento nos níveis de espécie reativas de oxigênio (ERO) por conta da sua metabolização e, como consequência, maior atividade das enzimas antioxidantes, como um mecanismo compensatório (Pomierny-Chamiolo et al., 2013). Neste estudo, foi observado que os animais IS apresentaram um status oxidativo global mais marcante após o desafio com DEP, com maiores níveis de ERO e maior atividade das enzimas antioxidantes. Por outro lado, a exposição à DRS promoveu a redução da atividade enzimática de uma das enzimas antioxidantes (catalase) e, também, menor produção de ERO. Em condições basais, o IS não afetou os parâmetros oxidativos, de forma similar ao que ocorreu com os parâmetros dopaminérgicos.

Estes resultados sugerem que o desafio com a DEP foi capaz de estimular de forma mais intensa o sistema dopaminérgico dos animais IS e possivelmente aumentar a liberação de dopamina no estriado/NAc. Por conseguinte, houve uma maior metabolização da mesma e consequentemente maior produção de ERO e maior atividade das enzimas antioxidantes. Estes achados indicam que um IS curto no período pré-púbere é capaz de induzir alterações no sistema dopaminérgico em desenvolvimento e aumentar a sensibilidade a psicoestimulantes na vida adulta.

Apesar dos animais IS terem apresentado maior resposta locomotora e maior atividade dopaminérgica em resposta a um psicoestimulante (DEP), quando esses animais foram expostos a um protocolo de preferência condicionada de lugar (CPP) para outro psicoestimulante (metilfenidato), eles apresentaram CPP, porém em níveis

semelhantes aos demais grupos. Estes achados indicam que os animais IS podem ser mais sensíveis a uma administração aguda de um psicoestimulante, como a DEP, porém é possível que a saliência da recompensa seja semelhante aos demais grupos. Por outro lado, uma dissociação entre os efeitos dos psicoestimulantes sobre a sensibilização locomotora, versus a CPP não é surpreendente, porque a resposta locomotora aguda ou a sensibilização nem sempre são correlacionadas com a CPP (Eisener-Dorman et al., 2011; Xu et al., 2016). A sensibilização locomotora e a CPP são dois índices que têm sido usados para avaliar adição a uma substância. Embora substâncias aditivas apresentem geralmente ambos CPP e sensibilização locomotora, a indução de um não garante que o outro também vai ocorrer (Strong et al., 2017). Strong e colaboradores (2017) observaram que os animais apresentaram sensibilização locomotora após injeções intermitentes de cetamina, bem como alterações neuroquímicas indicativas de adição, porém não apresentaram CPP. No presente estudo, a dose de metilfenidato utilizada foi capaz de induzir CPP em todos os animais, independente de alguns serem mais susceptíveis que outros. A dose de metilfenidato utilizada (3mg/Kg) é uma dose conhecida por induzir CPP em roedores (Meririnne et al., 2001; Thanos et al., 2010), portanto, pode ter ocorrido um efeito teto de recompensa sobre o paradigma de CPP com o metilfenidato. Estudos utilizando doses a partir de 1mg/Kg (1; 1,25; 3; 5 e 20 mg/kg) de metilfenidato não observaram diferença na magnitude da CPP nos animais avaliados (dela Pena et al., 2012; Meririnne et al., 2001; Thanos et al., 2010).

Os resultados até o momento nos levaram a aceitar a hipótese de que os animais que passaram por um curto período de isolamento social após o desmame sofreram algum tipo de programação no sistema dopaminérgico em desenvolvimento, de forma

que apresentaram uma maior sensibilidade a um psicoestimulante, acompanhada de uma maior ativação do sistema dopaminérgico estriatal. Neste contexto, e tendo em vista a possibilidade de sensibilização cruzada surgiu a pergunta: esses animais com um sistema dopaminérgico alterado e uma maior susceptibilidade à psicoestimulantes poderiam também responder de forma exacerbada à exposição a um alimento altamente palatável (Froot Loop®) na vida adulta?

Para responder a essa pergunta, os animais foram submetidos a uma tarefa de busca por alimento doce. Nesta tarefa comportamental, os animais foram submetidos previamente a um período de restrição alimentar de 24 horas antes do início do experimento e permaneceram recebendo apenas 80% do total de calorias consumidas diariamente ao longo dos 5 dias de habituação. Ao final do quinto dia da sessão de habituação, os animais foram alimentados *ad libitum* para a realização do teste no dia subsequente (Lampert et al., 2013). Os animais que foram submetidos ao IS no período pré-púbere apresentaram menor latência para chegar até o alimento, bem como para começar a comer e consumiram maior quantidade de Froot Loops® que os demais grupos, no dia do teste, mesmo estando no estado alimentado. Estas características estão de acordo com alguns dos critérios diagnósticos de compulsão alimentar que incluem: consumir grande quantidade de alimento em um curto período de tempo; consumir alimento mesmo sem estar fisiologicamente faminto e perda de controle sobre a ingestão alimentar (Montano et al., 2016). Este padrão de consumo excessivo desse tipo de alimento (altamente doce e processado) pode ser relacionado ao comportamento alimentar do tipo-aditivo (Avena et al., 2011; Gearhardt et al., 2009a), tendo em vista que a compulsão alimentar é um dos componentes de saliência para este fenômeno (Avena et al., 2008; Bak-Sosnowska, 2017; Wiss e Brewerton,

2017). Estudos em humanos, também, evidenciaram que indivíduos que atingem o critério de comportamento alimentar do tipo-aditivo consomem mais calorias em um estado saciado quando comparado com indivíduos que não apresentam esta característica (Ruddock et al., 2017).

A resposta exacerbada para a busca e consumo do alimento doce na tarefa comportamental por parte dos animais IS pode ter ocorrido, em parte, pelo fato destes animais apresentarem um nível basal de receptor de dopamina do tipo D2R menor que os demais grupos. Como mencionado anteriormente, os receptores de dopamina do tipo D2R são responsáveis pelo controle inibitório da liberação de dopamina (Bello et al., 2011; de Jong et al., 2015; Shi e McGinty, 2011). Portanto, uma redução dos níveis de D2R no NAc pode ter deixado os animais IS mais vulneráveis ao protocolo comportamental de busca pelo alimento doce.

Outros componentes envolvidos na tarefa comportamental podem ter estimulado esses animais mais vulneráveis a buscarem de forma mais intensa o alimento, como por exemplo: o tipo de alimento utilizado, o protocolo de exposição ao alimento e a antecipação decorrente do ambiente onde foi realizada a tarefa comportamental. O tipo de alimento palatável utilizado na tarefa pode ter influenciado no processo de “sensibilização” ao alimento. Estudos têm mostrado que alimentos altamente processados, ricos em açúcar, gorduras, sais, etc., têm um potencial aditivo maior, bem como maior probabilidade de gerar “fissura” e episódios compulsivos, quando comparado com alimentos mais nutritivos e não processados (Schulte et al., 2017). Alimentos altamente processados apresentam mais características de consumo em comum com as observadas no uso de drogas de abuso, por conta da alta dose e

rápida absorção e, portanto, são mais associados a comportamentos de vício/dependência (Wiss e Brewerton, 2017).

Além disso, o paradigma de acesso ao alimento doce parece ser crucial para o desenvolvimento de adição (Westwater et al., 2016). A associação da restrição alimentar (80%) ao paradigma de acesso intermitente (3 min/dia) ao alimento doce pode ter intensificado o valor da recompensa, resultando no aumento da “fissura” pelo alimento. Um período de restrição alimentar está relacionado também a um maior consumo de drogas de abuso (Avena et al., 2008). Ainda, a antecipação causada pela ambientação dos animais à sala onde eles receberiam o alimento também pode ter realçado o valor da recompensa nos animais susceptíveis. A liberação de dopamina ocorre tanto em resposta ao alimento palatável quanto em resposta às pistas que antecedem o mesmo (Yau e Potenza, 2013). Pistas que predizem a possibilidade de uma recompensa induzem um sinal maior de liberação de dopamina (Robinson et al., 2016; Volkow et al., 2011) e conseqüentemente um comportamento mais intenso de busca pelo esperado alimento/droga (Volkow et al., 2013). Além disso, a estimulação repetida das vias dopaminérgicas, neste caso, desencadeada tanto pela exposição diária ao alimento (Froot Loops®), quanto pela antecipação ao mesmo, pode causar adaptações neurobiológicas e promover progressivamente comportamentos compulsivos (Yau e Potenza, 2013). Em suma, o comportamento compulsivo frente a ingestão do Froot Loops® mesmo em um estado saciado, associada a redução dos receptores D2 no NAc indica que os animais submetidos ao IS no início da vida podem ser mais susceptíveis a desenvolver comportamentos aditivos relativos a alimento doce.

Em contrapartida aos resultados observados com o IS, a exposição crônica à DRS preveniu os efeitos do IS em relação à resposta locomotora, tanto basal, quando após o desafio com a DEP, como observado no capítulo 1. Este achado vai de encontro à teoria de que a DRS é capaz de amenizar os efeitos do estresse, atuando com um alimento confortante durante o período de IS (Dallman et al., 2005; MacKay et al., 2014; Ulrich-Lai et al., 2016). Por outro lado, a DRS não interferiu em outros parâmetros, antes ou após o desafio com a DEP. A DRS também não foi capaz de prevenir o comportamento de busca pelo Froot Loops®, observada nos animais SI no capítulo 2, nem interferiu na redução dos níveis de D2R. Nesse sentido, os resultados mostram que a exposição à DRS não foi capaz de prevenir os efeitos do estresse sobre o sistema dopaminérgico e tampouco foi capaz de induzir uma sensibilização da via mesolímbica dopaminérgica.

A ausência de efeito de dependência relacionado à DRS pode ser devido ao fato da exposição à dieta ter sido de forma contínua e crônica. Como mencionado acima, o paradigma de acesso ao alimento é crucial para o desenvolvimento de dependência (Westwater et al., 2016). Protocolos de acesso intermitente mostraram tais características, considerando o aumento no valor da recompensa. Westwater et al. (2016) ressaltaram que comportamentos aditivos relacionados à ingestão de alimento doce são observados apenas em regimes de acesso intermitente e não ocorrem quando o acesso é livre, *ad libitum*. Outros estudos utilizando acesso intermitente à dieta palatável evidenciaram uma maior resposta locomotora à AMPH que animais que passaram por uma dieta crônica (Avena et al., 2012; Fordahl et al., 2016). Além disso, a DRS oferecida era produzida em nosso laboratório, portanto livre de aditivos e acentuadores de sabor, como observados nos produtos industrializados, como é o

caso do Froot Loops®. Portanto, o padrão crônico e contínuo de exposição à DRS e a natureza da dieta palatável oferecida neste estudo pode não ter estimulado o sistema dopaminérgico de forma tão intensa, tanto nos animais controle que receberam a dieta, quanto nos animais IS, que são aparentemente mais sensíveis a comportamentos aditivos e a DRS inclusive preveniu seu efeito em alguns aspectos.

De modo geral, os principais achados deste estudo foram observados com a exposição curta ao IS no período pré-púbere. Estes achados indicam que um IS curto neste período sensível do desenvolvimento pode programar circuitos encefálicos em desenvolvimento, como o sistema dopaminérgico, de modo que estes animais se tornem mais susceptíveis a substâncias psicoestimulantes e a alimentos processados ricos em açúcar. Um dos possíveis mecanismos envolvidos na sensibilização cruzada entre estresse e uso de drogas/alimento palatável é através da maior liberação de CRF na VTA (Burke e Miczek, 2014; Lukkes et al., 2009; Mantsch et al., 2014). Foi visto que a ativação de receptores de CRF na VTA excita os neurônios dopaminérgicos, estimulando a liberação de DA no NAc e por conseguinte, o uso de drogas (Burke e Miczek, 2014; Holly e Miczek, 2016; Mantsch et al., 2014) e de alimento palatável (Zorrilla et al., 2014). Receptores de CRF do tipo 1 e do tipo 2 na VTA parecem ter papel importante no aumento da ingestão de cocaína em animais estressados (Burke e Miczek, 2014; Tunstall e Carmack, 2016). Além disso, há um estudo mostrando que o pré-tratamento com antagonista CRF1 diminuiu o consumo compulsivo de alimento palatável rico em açúcar (Zorrilla et al., 2014).

Tendo em vista o papel dos glicocorticoides e do CRF na modulação do sistema mesolímbico dopaminérgico e nos comportamentos aditivos, foram analisados os níveis plasmáticos de corticosterona nos animais imediatamente após as duas

semanas de IS. Contudo, não foram observadas alterações nos níveis de corticosterona nos animais que passaram pelo IS. Por outro lado, foi observada uma redução nos níveis de corticosterona plasmática nos animais de receberam a DRS. Estes dados indicam que a exposição a DRS pode estar atuando como alimento confortante (Dallman et al., 2005; Ulrich-Lai et al., 2016), e levando a uma redução na liberação de glicocorticoides, observando-se níveis basais de liberação de corticosterona menores, independente do animal ter sido estressado ou não.

A ausência de efeito sobre os níveis de corticosterona plasmática basal após a exposição ao IS já foi observada por outros autores (Arcego et al., 2017; Butler et al., 2014; Roeckner et al., 2017). No entanto, não pode ser refutada a possibilidade de ter ocorrido alguma programação no eixo HPA durante o período de IS. O que pode ter ocorrido é uma adaptação do sistema de resposta ao estresse, tendo em vista o período de duas semanas de isolamento social. Outros estudos que investigaram os efeitos do IS apenas observaram alterações nos níveis de corticosterona após um desafio estressor (Butler et al., 2014). Portanto, mais estudos são necessários para avaliar a possibilidade de algum tipo de alteração no sistema de resposta ao estresse nos animais submetidos ao IS no início da vida. Além disso, o papel do CRF sobre os comportamentos aditivos pode ser independente de sua regulação pelo eixo HPA. A produção e a atividade do CRF podem ser independentes da liberação de corticosterona e a liberação de glicocorticoides não atua inibindo a liberação de CRF em todas as regiões encefálicas, ao contrário, é capaz até mesmo de estimular a síntese de CRH em regiões extra-hipotalâmicas (Inda et al., 2017).

O CRF é capaz de modular a excitabilidade de neurônios DA na VTA, estimulando a neurotransmissão mesocorticolímbica e assim promovendo a busca por

drogas (Burke e Miczek, 2014; Mantsch et al., 2014) e por alimento palatável (Zorrilla et al., 2014). Se, por um lado, a atividade dos neurônios dopaminérgicos na VTA é crítica para o estímulo inicial de busca relacionada à recompensa, o ponto crítico para a progressão da adição é através do que ocorre no NAc, onde a informação referente à estimulação dopaminérgica modula as aferências glutamatérgicas a partir de regiões corticais e límbicas, induzindo o comportamento de busca pela substância (Cooper et al., 2017). Neste contexto, foram analisadas as correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) espontâneas nos MSN no NAc a fim de investigar um possível mecanismo responsável pelas alterações no sistema dopaminérgico induzidas pelo IS no início da vida. Os registros das CEPS mostraram um efeito da DRS sobre o tempo de subida e uma tendência à redução no tempo de decaimento. Além disso, foi observada uma tendência à interação estresse & dieta na frequência de disparos, em função de um possível aumento na frequência das CEPS causadas pelo IS e a prevenção da mesma pela exposição à DRS. Estes achados preliminares indicam que os animais que receberam a DRS parecem apresentar uma resposta excitatória fugaz. Estas alterações na cinética das CEPS podem indicar uma provável alteração nos receptores de glutamato nos MSN (Kasanetz e Manzoni, 2009). Alterações na sinalização glutamatérgica estão relacionadas a comportamentos aditivos, por conta da modulação da transmissão mesolímbica dopaminérgica (Kim et al., 2013; van Huijstee e Mansvelder, 2014). Evidências apontam que alguns neurônios dopaminérgicos da VTA co-liberam glutamato, promovendo a ativação de receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e N-metil-D-Aspartato (NMDA) nos MSN, concomitante à ativação dos D1R (Broussard, 2012; Wang et al., 2017). A ativação de receptores AMPA e NMDA, estão relacionados ao

aumento na busca por cocaína (Szumlinski et al., 2016; Wang et al., 2017). Portanto, a exposição ao IS no início da vida parece tornar o sistema mesolímbico dopaminérgico mais excitável (tendência à interação estresse e dieta na frequência das CEPS), enquanto que a exposição crônica à DRS parece interferir no sentido oposto, tornando a resposta glutamatérgica, oriunda dos inputs glutamatérgicos no NAc, mais tênue. Isto poderia explicar porque a DRS não apresentou maior resposta locomotora à DEP, e preveniu o efeito induzido pelo IS.

Outros sistemas também podem ter sido afetados com a exposição ao isolamento social no período pré-púbere e contribuído para a maior susceptibilidade a comportamentos aditivos. Lukkes e colaboradores (2009) verificaram que um isolamento social de 3 semanas após o desmame (PN21-42) foi capaz de aumentar os níveis de receptor de CRF do tipo 2 nos núcleos da rafe e, conseqüentemente, aumentar a liberação de serotonina no NAc, por exemplo (Lukkes et al., 2009). Além disso, as alterações a longo prazo no sistema dopaminérgico e a susceptibilidade a comportamentos aditivos induzidas pelo isolamento social no período pré-púbere podem resultar em alteração na poda sináptica, tendo em vista que o período entre os dias PN21-35 são críticos para esse fenômeno e alterações na poda sináptica podem afetar de forma permanente o sistema dopaminérgico e aumentar a susceptibilidade ao uso de drogas (Butler et al., 2014).

Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na programação do sistema dopaminérgico que ocorre durante o IS no período pré-púbere e que induz alterações a longo prazo e maior susceptibilidade a psicoestimulantes e a alimentos palatáveis. A utilização de um protocolo de sensibilização (Freese et al., 2012), bem como a avaliação da auto-administração de

um psicoestimulantes poderiam ajudar a esclarecer a magnitude da susceptibilidade à adição induzida pelo isolamento social no início da vida. Além disso, mais estudos são necessários para avaliar de que maneira especificamente a DRS é capaz de prevenir os efeitos do estresse e/ou estimular o sistema de recompensa.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, este estudo evidenciou os seguintes achados após o IS curto no período pré-púbere, associado à DRS crônica:

(1) O IS induziu maior resposta locomotora a um psicoestimulante (DEP), associada a maior sinalização dopaminérgica (indicada pelos níveis mais elevados de DAT, TH e níveis reduzidos de D2R) e maior produção de espécies reativas de oxigênio, bem como maiores níveis de enzimas antioxidantes no estriado após o desafio. Estes resultados indicam uma maior susceptibilidade à psicoestimulantes nos animais que foram submetidos ao IS no início da vida;

(2) O IS também induziu maior busca por um alimento altamente palatável (Froot Loops®), associada a uma redução dos níveis basais de D2R no NAc, sugerindo que estes animais possuem um déficit no controle inibitório do sistema dopaminérgico e maior susceptibilidade ao consumo compulsivo de alimento altamente palatável.

(3) A DRS foi capaz de prevenir o aumento da atividade locomotora induzida pela DEP nos animais IS e reduziu os níveis basais de corticosterona após o IS, indicando que ela atuou como alimento confortante, reduzindo a ativação do eixo HPA e prevenindo alguns efeitos do IS. Por outro lado, a DRS não foi capaz de prevenir os efeitos do IS sobre os parâmetros dopaminérgico analisados, tanto no estriado dorsal quanto no NAc. A DRS induziu, porém, uma redução no tempo de subida e uma tendência a redução no tempo de decaimento das CEPS no NAc, indicando que a resposta glutamatérgica (excitatória) pode ser mais tênue nestes animais.

(4) Se considerada a tendência a interação estresse & dieta observada na frequência das CEPS, pode-se pensar que o IS estimula mais os MSN no NAc, enquanto que a DRS previne este efeito, e ajuda a entender a oposição de efeitos observados com o IS e a DRS neste estudo.

Em suma, este estudo evidenciou a capacidade de apenas duas semanas de isolamento social no período pré-púbere em programar o sistema dopaminérgico desses animais de forma a aumentar a sensibilidade, tanto a psicoestimulantes, quanto ao consumo compulsivo de alimento altamente palatável. A exposição crônica à DRS não produziu modificações detectáveis pelas técnicas empregadas no sistema dopaminérgico, nem sensibilização cruzada com um psicoestimulante ou outro alimento palatável, pelo contrário, ela atuou, de modo geral, como alimento confortante, reduzindo os níveis basais de corticosterona plasmática e prevenindo alguns efeitos do IS.

Esta tese enfatiza o importante papel da exposição a um estressor como o isolamento social durante uma fase crítica do desenvolvimento, ressaltando a importância de intervenções nestes períodos e a grande probabilidade de alterações a longo prazo no sistema de recompensa, facilitando a aquisição de comportamentos aditivos.

Mais especificamente, o isolamento social, quando ocorre no período pré-púbere, é um fator programador do sistema dopaminérgico de forma a deixar os animais mais susceptíveis a substâncias com potencial aditivo. Neste sentido, dois importantes aspectos foram levantados: 1) a importância da exposição a um fator estressor como o isolamento social no período pré-púbere ser suficiente para

aumentar a resposta a psicoestimulantes na vida adulta, tendo em vista que a grande maioria dos estudos com isolamento social avalia exposições longas a esta condição e 2) este curto período de isolamento social é capaz, também, de alterar a resposta a alimento doce, estimulando comportamentos de fissura alimentar, indicando uma maior propensão a desenvolver um comportamento alimentar do tipo-aditivo. Este último aspecto tem ganhado maior atenção apenas nos últimos anos, sendo, portanto, um resultado que contribui substancialmente para a literatura relacionada a este tema.

Tendo em vista as dificuldades no tratamento tanto da dependência de drogas quanto de transtornos alimentares e o grande índice de recaída a estas substâncias, é de extrema relevância a identificação de fatores preditores de propensão, bem como a identificação dos mecanismos envolvidos com esses distúrbios pois permite prevenir o surgimento dos mesmos, além de permitir a identificação de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de estratégias de tratamento.

7. PERSPECTIVAS

- Investigar os mecanismos neurobiológicos específicos responsáveis pela programação do sistema dopaminérgico nos animais IS durante o período pré-púbere;
- Analisar outros parâmetros relacionados a adição para psicoestimulantes e para alimento altamente palatável nos animais IS;
- Avaliar outros marcadores relativos a adição no NAc e estriado dos animais IS;
- Analisar o sistema glutamatérgico envolvido com a transmissão sináptica excitatória no NAc tanto nos animais IS quanto nos que receberam a DRS;
- Avaliar as diferenças sexo-específicas para os parâmetros analisados.

REFERÊNCIAS

Adam, T.C., Epel, E.S. (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 91, 449-458.

Ahmed, S.H., Guillem, K., Vandaele, Y. (2013) Sugar addiction: pushing the drug-sugar analogy to the limit. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 434-439.

Amianto, F., Ottone, L., Abbate Daga, G., Fassino, S. (2015) Binge-eating disorder diagnosis and treatment: a recap in front of DSM-5. *BMC Psychiatry* 15, 70.

Anker, J.J., Carroll, M.E. (2011) Females are more vulnerable to drug abuse than males: evidence from preclinical studies and the role of ovarian hormones. *Curr Top Behav Neurosci* 8, 73-96.

Arakawa, H. (2003) The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Dev Psychobiol* 43, 11-19.

Arcego, D.M., Toniazzo, A.P., Krolow, R., Lampert, C., Berlitz, C., Dos Santos Garcia, E., do Couto Nicola, F., Hoppe, J.B., Gaelzer, M.M., Klein, C.P., Lazzaretti, C., Dalmaz, C. (2017) Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. *Mol Neurobiol*.

Atkinson, H.C., Waddell, B.J. (1997) Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 138, 3842-3848.

Avena, N.M. (2010) The study of food addiction using animal models of binge eating. *Appetite* 55, 734-737.

Avena, N.M., Bocarsly, M.E., Hoebel, B.G., Gold, M.S. (2011) Overlaps in the nosology of substance abuse and overeating: the translational implications of "food addiction". *Curr Drug Abuse Rev* 4, 133-139.

Avena, N.M., Carrillo, C.A., Needham, L., Leibowitz, S.F., Hoebel, B.G. (2004) Sugar-dependent rats show enhanced intake of unsweetened ethanol. *Alcohol* 34, 203-209.

Avena, N.M., Gold, J.A., Kroll, C., Gold, M.S. (2012) Further developments in the neurobiology of food and addiction: update on the state of the science. *Nutrition* 28, 341-343.

Avena, N.M., Gold, M.S. (2011) Sensitivity to alcohol in obese patients: a possible role for food addiction. *J Am Coll Surg* 213, 451; author reply 451-452.

Avena, N.M., Hoebel, B.G. (2003) A diet promoting sugar dependency causes behavioral cross-sensitization to a low dose of amphetamine. *Neuroscience* 122, 17-20.

Avena, N.M., Rada, P., Hoebel, B.G. (2008) Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 20-39.

Baarendse, P.J., Limpens, J.H., Vanderschuren, L.J. (2014) Disrupted social development enhances the motivation for cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 1695-1704.

Baik, J.H. (2013a) Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB Rep* 46, 519-526.

Baik, J.H. (2013b) Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits* 7, 152.

Bak-Sosnowska, M. (2017) Differential criteria for binge eating disorder and food addiction in the context of causes and treatment of obesity. *Psychiatr Pol* 51, 247-259.

Bello, E.P., Mateo, Y., Gelman, D.M., Noain, D., Shin, J.H., Low, M.J., Alvarez, V.A., Lovinger, D.M., Rubinstein, M. (2011) Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci* 14, 1033-1038.

Berridge, K.C. (1996) Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 1-25.

Berridge, K.C. (2009) 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav* 97, 537-550.

Berridge, K.C., Robinson, T.E. (2016) Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *Am Psychol* 71, 670-679.

Bertholomey, M.L., Nagarajan, V., Torregrossa, M.M. (2016) Sex differences in reinstatement of alcohol seeking in response to cues and yohimbine in rats with and without a history of adolescent corticosterone exposure. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 2277-2287.

Berthoud, H.R., Lenard, N.R., Shin, A.C. (2011) Food reward, hyperphagia, and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300, R1266-1277.

Bhatti, A.B., Haq, A.U. (2017) The Pathophysiology of Perceived Social Isolation: Effects on Health and Mortality. *Cureus* 9, e994.

Bobzean, S.A., DeNobrega, A.K., Perrotti, L.I. (2014) Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Exp Neurol* 259, 64-74.

Bock, R., Shin, J.H., Kaplan, A.R., Dobi, A., Markey, E., Kramer, P.F., Gremel, C.M., Christensen, C.H., Adrover, M.F., Alvarez, V.A. (2013) Strengthening the accumbal

indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat Neurosci* 16, 632-638.

Brewerton, T.D. (2017) Food addiction as a proxy for eating disorder and obesity severity, trauma history, PTSD symptoms, and comorbidity. *Eat Weight Disord* 22, 241-247.

Britt, J.P., Bonci, A. (2013) Optogenetic interrogations of the neural circuits underlying addiction. *Curr Opin Neurobiol* 23, 539-545.

Broussard, J.I. (2012) Co-transmission of dopamine and glutamate. *J Gen Physiol* 139, 93-96.

Brydges, N.M., Holmes, M.C., Harris, A.P., Cardinal, R.N., Hall, J. (2015) Early life stress produces compulsive-like, but not impulsive, behavior in females. *Behav Neurosci* 129, 300-308.

Burke, A.R., McCormick, C.M., Pellis, S.M., Lukkes, J.L. (2017) Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neurosci Biobehav Rev* 76, 280-300.

Burke, A.R., Miczek, K.A. (2014) Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 1557-1580.

Butler, T.R., Ariwodola, O.J., Weiner, J.L. (2014) The impact of social isolation on HPA axis function, anxiety-like behaviors, and ethanol drinking. *Front Integr Neurosci* 7, 102.

Butler, T.R., Karkhanis, A.N., Jones, S.R., Weiner, J.L. (2016) Adolescent Social Isolation as a Model of Heightened Vulnerability to Comorbid Alcoholism and Anxiety Disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 40, 1202-1214.

Calipari, E.S., Ferris, M.J., Salahpour, A., Caron, M.G., Jones, S.R. (2013) Methylphenidate amplifies the potency and reinforcing effects of amphetamines by increasing dopamine transporter expression. *Nat Commun* 4, 2720.

Calipari, E.S., Juarez, B., Morel, C., Walker, D.M., Cahill, M.E., Ribeiro, E., Roman-Ortiz, C., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Han, M.H., Nestler, E.J. (2017) Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. *Nat Commun* 8, 13877.

Canan, F., Karaca, S., Sogucak, S., Gecici, O., Kuloglu, M. (2017) Eating disorders and food addiction in men with heroin use disorder: a controlled study. *Eat Weight Disord* 22, 249-257.

Carboni, E., Vacca, C. (2003) Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. *Methods Mol Med* 79, 481-498.

Carr, C.P., Martins, C.M., Stingel, A.M., Lemgruber, V.B., Juruena, M.F. (2013) The role of early life stress in adult psychiatric disorders: a systematic review according to childhood trauma subtypes. *J Nerv Ment Dis* 201, 1007-1020.

Carroll, M.E., Anker, J.J. (2010) Sex differences and ovarian hormones in animal models of drug dependence. *Horm Behav* 58, 44-56.

Carroll, M.E., Lynch, W.J., Roth, M.E., Morgan, A.D., Cosgrove, K.P. (2004) Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends Pharmacol Sci* 25, 273-279.

Cathelain, S., Brunault, P., Ballon, N., Reveillere, C., Courtois, R. (2016) [Food addiction: Definition, measurement and limits of the concept, associated factors, therapeutic and clinical implications]. *Presse Med* 45, 1154-1163.

Chen, Y., Zheng, X., Xie, L., Huang, L., Ke, Z., Zheng, J., Lu, H., Hu, J. (2017) Glucocorticoids/glucocorticoid receptors effect on dopaminergic neurotransmitters in ADHD rats. *Brain Res Bull* 131, 214-220.

Clemow, D.B. (2015) Misuse of Methylphenidate. *Curr Top Behav Neurosci*.

Collins, G.T., Chen, Y., Tschumi, C., Rush, E.L., Mensah, A., Koek, W., France, C.P. (2015) Effects of consuming a diet high in fat and/or sugar on the locomotor effects of acute and repeated cocaine in male and female C57BL/6J mice. *Exp Clin Psychopharmacol* 23, 228-237.

Cooper, S., Robison, A.J., Mazei-Robison, M.S. (2017) Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics* 14, 687-697.

Cortes-Patino, D.M., Serrano, C., Garcia-Mijares, M. (2016) Early social isolation increases persistence of alcohol-seeking behavior in alcohol-related contexts. *Behav Pharmacol* 27, 185-191.

Couto-Pereira, N.S., Ferreira, C.F., Lampert, C., Arcego, D.M., Toniazzo, A.P., Bernardi, J.R., da Silva, D.C., Von Poser Toigo, E., Diehl, L.A., Krolow, R., Silveira, P.P., Dalmaz, C. (2016) Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. *Int J Dev Neurosci* 55, 72-81.

Cummins, E.D., Griffin, S.B., Burgess, K.C., Peterson, D.J., Watson, B.D., Buendia, M.A., Stanwood, G.D., Brown, R.W. (2013) Methylphenidate place conditioning in adolescent rats: an analysis of sex differences and the dopamine transporter. *Behav Brain Res* 257, 215-223.

Cunningham, C.L., Ferree, N.K., Howard, M.A. (2003) Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 170, 409-422.

Cunningham, C.L., Gremel, C.M., Groblewski, P.A. (2006) Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc* 1, 1662-1670.

Dallman, M.F. (2010) Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 21, 159-165.

Dallman, M.F., Pecoraro, N.C., la Fleur, S.E. (2005) Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun* 19, 275-280.

Davis, C. (2017) A commentary on the associations among 'food addiction', binge eating disorder, and obesity: Overlapping conditions with idiosyncratic clinical features. *Appetite* 115, 3-8.

Davis, C., Mackew, L., Levitan, R.D., Kaplan, A.S., Carter, J.C., Kennedy, J.L. (2017) Binge Eating Disorder (BED) in Relation to Addictive Behaviors and Personality Risk Factors. *Front Psychol* 8, 579.

Davis, J.F., Tracy, A.L., Schurdak, J.D., Tschop, M.H., Lipton, J.W., Clegg, D.J., Benoit, S.C. (2008) Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behav Neurosci* 122, 1257-1263.

De Cosmi, V., Scaglioni, S., Agostoni, C. (2017) Early Taste Experiences and Later Food Choices. *Nutrients* 9.

de Jong, J.W., Roelofs, T.J., Mol, F.M., Hillen, A.E., Meijboom, K.E., Luijendijk, M.C., van der Eerden, H.A., Garner, K.M., Vanderschuren, L.J., Adan, R.A. (2015) Reducing Ventral Tegmental Dopamine D2 Receptor Expression Selectively Boosts Incentive Motivation. *Neuropsychopharmacology* 40, 2085-2095.

dela Pena, I., Lee, J.C., Lee, H.L., Woo, T.S., Lee, H.C., Sohn, A.R., Cheong, J.H. (2012) Differential behavioral responses of the spontaneously hypertensive rat to methylphenidate and methamphetamine: lack of a rewarding effect of repeated methylphenidate treatment. *Neurosci Lett* 514, 189-193.

Dimitrijevic, I., Popovic, N., Sabljak, V., Skodric-Trifunovic, V., Dimitrijevic, N. (2015) Food addiction-diagnosis and treatment. *Psychiatr Danub* 27, 101-106.

Doom, J.R., Vanzomeren-Dohm, A.A., Simpson, J.A. (2016) Early unpredictability predicts increased adolescent externalizing behaviors and substance use: A life history perspective. *Dev Psychopathol* 28, 1505-1516.

Dwyer, J.B., Leslie, F.M. (2016) Adolescent Maturation of Dopamine D1 and D2 Receptor Function and Interactions in Rodents. *PLoS One* 11, e0146966.

Eisener-Dorman, A.F., Grabowski-Boase, L., Tarantino, L.M. (2011) Cocaine locomotor activation, sensitization and place preference in six inbred strains of mice. *Behav Brain Funct* 7, 29.

Elman, I., Karlsgodt, K.H., Gastfriend, D.R. (2001) Gender differences in cocaine craving among non-treatment-seeking individuals with cocaine dependence. *Am J Drug Alcohol Abuse* 27, 193-202.

Epel, E., Lapidus, R., McEwen, B., Brownell, K. (2001) Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26, 37-49.

Espana, R.A., Jones, S.R. (2013) Presynaptic dopamine modulation by stimulant self-administration. *Front Biosci (Schol Ed)* 5, 261-276.

Fabricius, K., Helboe, L., Fink-Jensen, A., Wortwein, G., Steiniger-Brach, B., Sotty, F. (2010) Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study. *Neurosci Lett* 482, 117-122.

Fabricius, K., Steiniger-Brach, B., Helboe, L., Fink-Jensen, A., Wortwein, G. (2011) Socially isolated rats exhibit changes in dopamine homeostasis pertinent to schizophrenia. *Int J Dev Neurosci* 29, 347-350.

Fareri, D.S., Tottenham, N. (2016) Effects of early life stress on amygdala and striatal development. *Dev Cogn Neurosci* 19, 233-247.

Ferriter, C., Ray, L.A. (2011) Binge eating and binge drinking: an integrative review. *Eat Behav* 12, 99-107.

Fone, K.C., Porkess, M.V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1087-1102.

Fordahl, S.C., Locke, J.L., Jones, S.R. (2016) High fat diet augments amphetamine sensitization in mice: Role of feeding pattern, obesity, and dopamine terminal changes. *Neuropharmacology* 109, 170-182.

Freese, L., Muller, E.J., Souza, M.F., Couto-Pereira, N.S., Tosca, C.F., Ferigolo, M., Barros, H.M. (2012) GABA system changes in methylphenidate sensitized female rats. *Behav Brain Res* 231, 181-186.

Garcia-Keller, C., Martinez, S.A., Esparza, M.A., Bollati, F., Kalivas, P.W., Cancela, L.M. (2013) Cross-sensitization between cocaine and acute restraint stress is

associated with sensitized dopamine but not glutamate release in the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 37, 982-995.

Garcia-Mijares, M., Bernardes, A.M., Silva, M.T. (2009) Diethylpropion produces psychostimulant and reward effects. *Pharmacol Biochem Behav* 91, 621-628.

Gearhardt, A.N., Corbin, W.R., Brownell, K.D. (2009a) Food addiction: an examination of the diagnostic criteria for dependence. *J Addict Med* 3, 1-7.

Gearhardt, A.N., Corbin, W.R., Brownell, K.D. (2009b) Preliminary validation of the Yale Food Addiction Scale. *Appetite* 52, 430-436.

Gearhardt, A.N., Davis, C., Kushner, R., Brownell, K.D. (2011a) The addiction potential of hyperpalatable foods. *Curr Drug Abuse Rev* 4, 140-145.

Gearhardt, A.N., White, M.A., Potenza, M.N. (2011b) Binge eating disorder and food addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 4, 201-207.

Goodman, M.L., Grouls, A., Chen, C.X., Keiser, P.H., Gitari, S. (2016) Adverse Childhood Experiences Predict Alcohol Consumption Patterns Among Kenyan Mothers. *Subst Use Misuse*, 1-7.

Gordon, H.W. (2002) Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology* 27, 115-126.

Hall, F.S., Wilkinson, L.S., Humby, T., Inglis, W., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Robbins, T.W. (1998) Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav* 59, 859-872.

Hardaway, J.A., Crowley, N.A., Bulik, C.M., Kash, T.L. (2015) Integrated circuits and molecular components for stress and feeding: implications for eating disorders. *Genes Brain Behav* 14, 85-97.

Haupt, M., Schaefer, A.T. (2010) Effects of postweaning social and physical deprivation on locomotor activity patterns and explorative behavior in female CD-1 mice. *Dev Psychobiol* 52, 383-393.

Heidbreder, C.A., Weiss, I.C., Domeney, A.M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, J., Moran, M.C., Nelson, P. (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100, 749-768.

Heinsbroek, J.A., Neuhofer, D.N., Griffin, W.C., 3rd, Siegel, G.S., Bobadilla, A.C., Kupchik, Y.M., Kalivas, P.W. (2017) Loss of Plasticity in the D2-Accumbens Pallidal Pathway Promotes Cocaine Seeking. *J Neurosci* 37, 757-767.

Herrmann, A.P., Benvenuti, R., Pilz, L.K., Elisabetsky, E. (2014) N-acetylcysteine prevents increased amphetamine sensitivity in social isolation-reared mice. *Schizophr Res* 155, 109-111.

Hickey, A.J., Reynolds, J.N., Beninger, R.J. (2012) Post-weaning social isolation and subchronic NMDA glutamate receptor blockade: effects on locomotor activity and GABA signaling in the rat suggest independent mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav* 101, 231-238.

Holder, M.K., Blaustein, J.D. (2014) Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. *Front Neuroendocrinol* 35, 89-110.

Holly, E.N., Miczek, K.A. (2016) Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 163-186.

Ikemoto, S., Bonci, A. (2014) Neurocircuitry of drug reward. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 329-341.

Inda, C., Armando, N.G., Dos Santos Claro, P.A., Silberstein, S. (2017) Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocr Connect*.

Ishihama, T., Ago, Y., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., Takuma, K., Matsuda, T. (2010) Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioral abnormalities in adult PACAP-deficient mice. *Behav Brain Res* 209, 274-280.

Ji, X., Saha, S., Kolpakova, J., Guildford, M., Tapper, A.R., Martin, G.E. (2017) Dopamine Receptors Differentially Control Binge Alcohol Drinking-Mediated Synaptic Plasticity of the Core Nucleus Accumbens Direct and Indirect Pathways. *J Neurosci* 37, 5463-5474.

Jiang, X., Nardelli, J. (2016) Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis* 92, 3-17.

Joffe, M.E., Grueter, B.A. (2016) Cocaine Experience Enhances Thalamo-Accumbens N-Methyl-D-Aspartate Receptor Function. *Biol Psychiatry* 80, 671-681.

Kai, N., Nishizawa, K., Tsutsui, Y., Ueda, S., Kobayashi, K. (2015) Differential roles of dopamine D1 and D2 receptor-containing neurons of the nucleus accumbens shell in behavioral sensitization. *J Neurochem* 135, 1232-1241.

Kalivas, P.W., Stewart, J. (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16, 223-244.

Karkhanis, A.N., Locke, J.L., McCool, B.A., Weiner, J.L., Jones, S.R. (2014) Social isolation rearing increases nucleus accumbens dopamine and norepinephrine responses to acute ethanol in adulthood. *Alcohol Clin Exp Res* 38, 2770-2779.

Kasanetz, F., Manzoni, O.J. (2009) Maturation of excitatory synaptic transmission of the rat nucleus accumbens from juvenile to adult. *J Neurophysiol* 101, 2516-2527.

Kessler, R.C., McLaughlin, K.A., Green, J.G., Gruber, M.J., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M., Aguilar-Gaxiola, S., Alhamzawi, A.O., Alonso, J., Angermeyer, M., Benjet, C., Bromet, E., Chatterji, S., de Girolamo, G., Demyttenaere, K., Fayyad, J., Florescu, S., Gal, G., Gureje, O., Haro, J.M., Hu, C.Y., Karam, E.G., Kawakami, N., Lee, S., Lepine, J.P., Ormel, J., Posada-Villa, J., Sagar, R., Tsang, A., Ustun, T.B., Vassilev, S., Viana, M.C., Williams, D.R. (2010) Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *Br J Psychiatry* 197, 378-385.

Khibnik, L.A., Beaumont, M., Doyle, M., Heshmati, M., Slesinger, P.A., Nestler, E.J., Russo, S.J. (2016) Stress and Cocaine Trigger Divergent and Cell Type-Specific Regulation of Synaptic Transmission at Single Spines in Nucleus Accumbens. *Biol Psychiatry* 79, 898-905.

Kim, M., Kim, W., Baik, J.H., Yoon, B.J. (2013) Different locomotor sensitization responses to repeated cocaine injections are associated with differential phosphorylation of GluA1 in the dorsomedial striatum of adult rats. *Behav Brain Res* 257, 71-76.

Klegeris, A., Korkina, L.G., Greenfield, S.A. (1995) Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free Radic Biol Med* 18, 215-222.

Ko, C.Y., Liu, Y.P. (2015) Isolation rearing impaired sensorimotor gating but increased pro-inflammatory cytokines and disrupted metabolic parameters in both sexes of rats. *Psychoneuroendocrinology* 55, 173-183.

Koob, G.F., Volkow, N.D. (2016) Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3, 760-773.

Kucher, E.O., Egorov, A.Y., Chernikova, N.A. (2016) [Early social isolation increases alcohol preference in experiment]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 116, 52-57.

Lampert, C., Arcego, D.M., Laureano, D.P., Diehl, L.A., da Costa Lima, I.F., Krolow, R., Pettenuzzo, L.F., Dalmaz, C., Vendite, D. (2013) Effect of chronic administration of tamoxifen and/or estradiol on feeding behavior, palatable food and metabolic parameters in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 119, 17-24.

Lander, S.S., Linder-Shacham, D., Gaisler-Salomon, I. (2017) Differential effects of social isolation in adolescent and adult mice on behavior and cortical gene expression. *Behav Brain Res* 316, 245-254.

Larson, E.B., Roth, M.E., Anker, J.J., Carroll, M.E. (2005) Effect of short- vs. long-term estrogen on reinstatement of cocaine-seeking behavior in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 98-108.

Lenoir, M., Serre, F., Cantin, L., Ahmed, S.H. (2007) Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS One* 2, e698.

Lepora, N.F., Blomeley, C.P., Hoyland, D., Bracci, E., Overton, P.G., Gurney, K. (2011) A simple method for characterizing passive and active neuronal properties: application to striatal neurons. *Eur J Neurosci* 34, 1390-1405.

Lomanowska, A.M., Ammari, N., Kraemer, G.W. (2010) Interactions between the effects of early isolation rearing and complex housing on adult locomotor activity and sensitivity to amphetamine in rats involve noradrenergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* 95, 100-105.

Lukkes, J.L., Engelman, G.H., Zelin, N.S., Hale, M.W., Lowry, C.A. (2012) Post-weaning social isolation of female rats, anxiety-related behavior, and serotonergic systems. *Brain Res* 1443, 1-17.

Lukkes, J.L., Summers, C.H., Scholl, J.L., Renner, K.J., Forster, G.L. (2009) Early life social isolation alters corticotropin-releasing factor responses in adult rats. *Neuroscience* 158, 845-855.

MacKay, J.C., James, J.S., Cayer, C., Kent, P., Anisman, H., Merali, Z. (2014) Protracted effects of juvenile stressor exposure are mitigated by access to palatable food. *PLoS One* 9, e96573.

Majcher-Maslanka, I., Solarz, A., Wedzony, K., Chocyk, A. (2017) The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. *Int J Dev Neurosci* 57, 24-33.

Manduca, A., Servadio, M., Damsteegt, R., Campolongo, P., Vanderschuren, L.J., Trezza, V. (2016) Dopaminergic Neurotransmission in the Nucleus Accumbens Modulates Social Play Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology* 41, 2215-2223.

Mantsch, J.R., Vranjkovic, O., Twining, R.C., Gasser, P.J., McReynolds, J.R., Blacktop, J.M. (2014) Neurobiological mechanisms that contribute to stress-related cocaine use. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 383-394.

Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A.P. (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62, 609-614.

- Martinez, L.A., Gross, K.S., Himmler, B.T., Emmitt, N.L., Peterson, B.M., Zlebnik, N.E., Foster Olive, M., Carroll, M.E., Meisel, R.L., Mermelstein, P.G. (2016) Estradiol Facilitation of Cocaine Self-Administration in Female Rats Requires Activation of mGluR5. *eNeuro* 3.
- Matas, E., Bock, J., Braun, K. (2016) The Impact of Parent-Infant Interaction on Epigenetic Plasticity Mediating Synaptic Adaptations in the Infant Brain. *Psychopathology* 49, 201-210.
- McCormick, C.M. (2010) An animal model of social instability stress in adolescence and risk for drugs of abuse. *Physiol Behav* 99, 194-203.
- Meririnne, E., Kankaanpaa, A., Seppala, T. (2001) Rewarding properties of methylphenidate: sensitization by prior exposure to the drug and effects of dopamine D1- and D2-receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 539-550.
- Meule, A., Gearhardt, A.N. (2014) Food addiction in the light of DSM-5. *Nutrients* 6, 3653-3671.
- Montano, C.B., Rasgon, N.L., Herman, B.K. (2016) Diagnosing binge eating disorder in a primary care setting. *Postgrad Med* 128, 115-123.
- Morin, J.P., Rodriguez-Duran, L.F., Guzman-Ramos, K., Perez-Cruz, C., Ferreira, G., Diaz-Cintra, S., Pacheco-Lopez, G. (2017) Palatable Hyper-Caloric Foods Impact on Neuronal Plasticity. *Front Behav Neurosci* 11, 19.
- Murphy, C.M., Stojek, M.K., MacKillop, J. (2014) Interrelationships among impulsive personality traits, food addiction, and Body Mass Index. *Appetite* 73, 45-50.
- Murray, S., Tulloch, A., Gold, M.S., Avena, N.M. (2014) Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 10, 540-552.
- Neisewander, J.L., Peartree, N.A., Pentkowski, N.S. (2012) Emotional valence and context of social influences on drug abuse-related behavior in animal models of social stress and prosocial interaction. *Psychopharmacology (Berl)* 224, 33-56.
- Nentwig, T.B., Myers, K.P., Grisel, J.E. (2017) Initial subjective reward to alcohol in Sprague-Dawley rats. *Alcohol* 58, 19-22.
- Nicolas, C., Lafay-Chebassier, C., Solinas, M. (2016) Exposure to sucrose during periods of withdrawal does not reduce cocaine-seeking behavior in rats. *Sci Rep* 6, 23272.
- Nolan, L.J. (2017) Is it time to consider the "food use disorder?". *Appetite* 115, 16-18.

Oswald, L.M., Wand, G.S., Kuwabara, H., Wong, D.F., Zhu, S., Brasic, J.R. (2014) History of childhood adversity is positively associated with ventral striatal dopamine responses to amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 2417-2433.

Pankevich, D.E., Bale, T.L. (2008) Stress and sex influences on food-seeking behaviors. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1539-1544.

Paulus, M.P., Bakshi, V.P., Geyer, M.A. (1998) Isolation rearing affects sequential organization of motor behavior in post-pubertal but not pre-pubertal Lister and Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 94, 271-280.

Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, M.F. (2004) Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145, 3754-3762.

Pedram, P., Wadden, D., Amini, P., Gulliver, W., Randell, E., Cahill, F., Vasdev, S., Goodridge, A., Carter, J.C., Zhai, G., Ji, Y., Sun, G. (2013) Food addiction: its prevalence and significant association with obesity in the general population. *PLoS One* 8, e74832.

Pomierny-Chamiolo, L., Moniczewski, A., Wydra, K., Suder, A., Filip, M. (2013) Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. *Neurotox Res* 23, 92-102.

Pursey, K.M., Stanwell, P., Gearhardt, A.N., Collins, C.E., Burrows, T.L. (2014) The prevalence of food addiction as assessed by the Yale Food Addiction Scale: a systematic review. *Nutrients* 6, 4552-4590.

Randolph, T.G. (1956) The descriptive features of food addiction; addictive eating and drinking. *Q J Stud Alcohol* 17, 198-224.

Rane, A., Church, S., Bhatia, U., Orford, J., Velleman, R., Nadkarni, A. (2017) Psychosocial interventions for addiction-affected families in Low and Middle Income Countries: A systematic review. *Addict Behav* 74, 1-8.

Reichelt, A.C. (2016) Adolescent Maturation Transitions in the Prefrontal Cortex and Dopamine Signaling as a Risk Factor for the Development of Obesity and High Fat/High Sugar Diet Induced Cognitive Deficits. *Front Behav Neurosci* 10, 189.

Robinson, M.J., Fischer, A.M., Ahuja, A., Lesser, E.N., Maniates, H. (2016) Roles of "Wanting" and "Liking" in Motivating Behavior: Gambling, Food, and Drug Addictions. *Curr Top Behav Neurosci* 27, 105-136.

Rodrigues, A.J., Leao, P., Carvalho, M., Almeida, O.F., Sousa, N. (2011) Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 107-120.

- Roeckner, A.R., Bowling, A., Butler, T.R. (2017) Chronic social instability increases anxiety-like behavior and ethanol preference in male Long Evans rats. *Physiol Behav* 173, 179-187.
- Ruddock, H.K., Field, M., Hardman, C.A. (2017) Exploring food reward and calorie intake in self-perceived food addicts. *Appetite* 115, 36-44.
- Rutters, F., Nieuwenhuizen, A.G., Lemmens, S.G., Born, J.M., Westerterp-Plantenga, M.S. (2009) Acute stress-related changes in eating in the absence of hunger. *Obesity (Silver Spring)* 17, 72-77.
- Santamaria, A., Arias, H.R. (2010) Neurochemical and behavioral effects elicited by bupropion and diethylpropion in rats. *Behav Brain Res* 211, 132-139.
- Schmitz, Y., Lee, C.J., Schmauss, C., Gonon, F., Sulzer, D. (2001) Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *J Neurosci* 21, 5916-5924.
- Schneeberger, A.R., Huber, C.G., Seixas, A., Muenzenmaier, K.H., Lang, U.E., Castille, D., Larkin, S., Link, B.G. (2017) Alcohol consumption and the use of health care services in people with severe mental illness and stressful childhood experiences. *J Addict Dis*, 0.
- Schulte, E.M., Gearhardt, A.N. (2017) Development of the Modified Yale Food Addiction Scale Version 2.0. *Eur Eat Disord Rev* 25, 302-308.
- Schulte, E.M., Potenza, M.N., Gearhardt, A.N. (2017) A commentary on the "eating addiction" versus "food addiction" perspectives on addictive-like food consumption. *Appetite* 115, 9-15.
- Scofield, M.D., Heinsbroek, J.A., Gipson, C.D., Kupchik, Y.M., Spencer, S., Smith, A.C., Roberts-Wolfe, D., Kalivas, P.W. (2016) The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacol Rev* 68, 816-871.
- Shao, Y., Yan, G., Xuan, Y., Peng, H., Huang, Q.J., Wu, R., Xu, H. (2015) Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus. *Behav Brain Res* 282, 201-208.
- Shen, M.Y., Perreault, M.L., Fan, T., George, S.R. (2015) The dopamine D1-D2 receptor heteromer exerts a tonic inhibitory effect on the expression of amphetamine-induced locomotor sensitization. *Pharmacol Biochem Behav* 128, 33-40.
- Shi, X., McGinty, J.F. (2011) D1 and D2 dopamine receptors differentially mediate the activation of phosphoproteins in the striatum of amphetamine-sensitized rats. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 653-663.

Shin, S.H., Miller, D.P., Teicher, M.H. (2013) Exposure to childhood neglect and physical abuse and developmental trajectories of heavy episodic drinking from early adolescence into young adulthood. *Drug Alcohol Depend* 127, 31-38.

Sim, H.R., Choi, T.Y., Lee, H.J., Kang, E.Y., Yoon, S., Han, P.L., Choi, S.Y., Baik, J.H. (2013) Role of dopamine D2 receptors in plasticity of stress-induced addictive behaviours. *Nat Commun* 4, 1579.

Simpson, S.M., Menard, J.L., Reynolds, J.N., Beninger, R.J. (2010) Post-weaning social isolation increases activity in a novel environment but decreases defensive burying and subchronic MK-801 enhances the activity but not the burying effect in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 95, 72-79.

Sinha, R., Jastreboff, A.M. (2013) Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biol Psychiatry* 73, 827-835.

Spear, L.P. (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 417-463.

Stairs, D.J., Prendergast, M.A., Bardo, M.T. (2011) Environmental-induced differences in corticosterone and glucocorticoid receptor blockade of amphetamine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 218, 293-301.

Strong, C.E., Schoepfer, K.J., Dossat, A.M., Saland, S.K., Wright, K.N., Kabbaj, M. (2017) Locomotor sensitization to intermittent ketamine administration is associated with nucleus accumbens plasticity in male and female rats. *Neuropharmacology* 121, 195-203.

Sulzer, D. (2011) How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69, 628-649.

Szumliński, K.K., Wroten, M.G., Miller, B.W., Sacramento, A.D., Cohen, M., Ben-Shahar, O., Kippin, T.E. (2016) Cocaine Self-Administration Elevates GluN2B within dmPFC Mediating Heightened Cue-Elicited Operant Responding. *J Drug Abuse* 2.

Teodorak, B.P., Ferreira, G.K., Scaini, G., Wessler, L.B., Heylmann, A.S., Deroza, P., Valvassori, S.S., Zugno, A.I., Quevedo, J., Streck, E.L. (2015) Acute administration of fenproporex increased acetylcholinesterase activity in brain of young rats. *An Acad Bras Cienc* 87, 1389-1395.

Thanos, P.K., Bermeo, C., Rubinstein, M., Suchland, K.L., Wang, G.J., Grandy, D.K., Volkow, N.D. (2010) Conditioned place preference and locomotor activity in response to methylphenidate, amphetamine and cocaine in mice lacking dopamine D4 receptors. *J Psychopharmacol* 24, 897-904.

- Tirelli, E., Laviola, G., Adriani, W. (2003) Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 163-178.
- Tomasi, D., Wang, G.J., Wang, R., Caparelli, E.C., Logan, J., Volkow, N.D. (2015) Overlapping patterns of brain activation to food and cocaine cues in cocaine abusers: association to striatal D2/D3 receptors. *Hum Brain Mapp* 36, 120-136.
- Toth, M., Mikics, E., Tulogdi, A., Aliczki, M., Haller, J. (2011) Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. *Horm Behav* 60, 28-36.
- Tottenham, N., Galvan, A. (2016) Stress and the adolescent brain: Amygdala-prefrontal cortex circuitry and ventral striatum as developmental targets. *Neurosci Biobehav Rev* 70, 217-227.
- Trainor, B.C. (2011) Stress responses and the mesolimbic dopamine system: social contexts and sex differences. *Horm Behav* 60, 457-469.
- Tunstall, B.J., Carmack, S.A. (2016) Social Stress-Induced Alterations in CRF Signaling in the VTA Facilitate the Emergence of Addiction-like Behavior. *J Neurosci* 36, 8780-8782.
- Ulrich-Lai, Y.M. (2016) Self-medication with sucrose. *Curr Opin Behav Sci* 9, 78-83.
- Ulrich-Lai, Y.M., Christiansen, A.M., Wang, X., Song, S., Herman, J.P. (2016) Statistical modeling implicates neuroanatomical circuit mediating stress relief by 'comfort' food. *Brain Struct Funct* 221, 3141-3156.
- Uzunian, L.G., Vitalle, M.S. (2015) Social skills: a factor of protection against eating disorders in adolescents. *Cien Saude Colet* 20, 3495-3508.
- van Dyck, L.I., Morrow, E.M. (2017) Genetic control of postnatal human brain growth. *Curr Opin Neurol* 30, 114-124.
- van Huijstee, A.N., Mansvelder, H.D. (2014) Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. *Front Cell Neurosci* 8, 466.
- Vanderschuren, L.J., Achterberg, E.J., Trezza, V. (2016) The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 70, 86-105.
- Vanderschuren, L.J., Kalivas, P.W. (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151, 99-120.

- Varty, G.B., Paulus, M.P., Braff, D.L., Geyer, M.A. (2000) Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry* 47, 864-873.
- Volkow, N.D., Li, T.K. (2004) Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nat Rev Neurosci* 5, 963-970.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Tomasi, D., Telang, F. (2011) Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15037-15042.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Tomasi, D., Baler, R.D. (2013) Obesity and addiction: neurobiological overlaps. *Obes Rev* 14, 2-18.
- Wang, D.V., Viereckel, T., Zell, V., Konradsson-Geuken, A., Broker, C.J., Talishinsky, A., Yoo, J.H., Galinato, M.H., Arvidsson, E., Kesner, A.J., Hnasko, T.S., Wallen-Mackenzie, A., Ikemoto, S. (2017) Disrupting Glutamate Co-transmission Does Not Affect Acquisition of Conditioned Behavior Reinforced by Dopamine Neuron Activation. *Cell Rep* 18, 2584-2591.
- Wang, Y.C., Ho, U.C., Ko, M.C., Liao, C.C., Lee, L.J. (2012) Differential neuronal changes in medial prefrontal cortex, basolateral amygdala and nucleus accumbens after postweaning social isolation. *Brain Struct Funct* 217, 337-351.
- Westenbroek, C., Perry, A.N., Becker, J.B. (2013) Pair housing differentially affects motivation to self-administer cocaine in male and female rats. *Behav Brain Res* 252, 68-71.
- Westwater, M.L., Fletcher, P.C., Ziauddeen, H. (2016) Sugar addiction: the state of the science. *Eur J Nutr* 55, 55-69.
- Wiss, D.A., Brewerton, T.D. (2017) Incorporating food addiction into disordered eating: the disordered eating food addiction nutrition guide (DEFANG). *Eat Weight Disord* 22, 49-59.
- Xu, P., Qiu, Y., Zhang, Y., Betaai, Y., Xu, P., Liu, Y., Kim, J.H., Shen, H.W. (2016) The Effects of 4-Methylethcathinone on Conditioned Place Preference, Locomotor Sensitization, and Anxiety-Like Behavior: A Comparison with Methamphetamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 19.
- Yau, Y.H., Potenza, M.N. (2013) Stress and eating behaviors. *Minerva Endocrinol* 38, 255-267.
- Yoon, H.S., Cai, W.T., Lee, Y.H., Park, K.T., Lee, Y.S., Kim, J.H. (2016) The expression of methiopropamine-induced locomotor sensitization requires dopamine D2, but not D1, receptor activation in the rat. *Behav Brain Res* 311, 403-407.

Yorgason, J.T., Calipari, E.S., Ferris, M.J., Karkhanis, A.N., Fordahl, S.C., Weiner, J.L., Jones, S.R. (2016) Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum. *Neuropharmacology* 101, 471-479.

Yorgason, J.T., Espana, R.A., Konstantopoulos, J.K., Weiner, J.L., Jones, S.R. (2013) Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. *Eur J Neurosci* 37, 1022-1031.

Zhu, X., Ottenheimer, D., DiLeone, R.J. (2016) Activity of D1/2 Receptor Expressing Neurons in the Nucleus Accumbens Regulates Running, Locomotion, and Food Intake. *Front Behav Neurosci* 10, 66.

Zorrilla, E.P., Logrip, M.L., Koob, G.F. (2014) Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction. *Front Neuroendocrinol* 35, 234-244.