

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
NEUROCIÊNCIAS

DANIELA PEREIRA LAUREANO

RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO (RCIU) MODIFICA A RESPOSTA
AO ALIMENTO PALATÁVEL EM RATOS – ESTUDO DA VIA DOPAMINÉRGICA E
OPIOIDÉRGICA

Porto Alegre

2018

DANIELA PEREIRA LAUREANO

RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO (RCIU) MODIFICA A RESPOSTA
AO ALIMENTO PALATÁVEL EM RATOS – ESTUDO DA VIA DOPAMINÉRGICA E
OPIOIDÉRGICA

A apresentação desta Tese é exigência do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Pelufo Silveira
Orientadores no Doutorado Sanduíche no Exterior: Prof^a Dr^a Mina Desai e Prof Dr Michael G Ross

Porto Alegre

2018

DEDICATÓRIA

Dedico essa grande conquista a meus pais Olmiro e Araci, a meus irmãos Viviane e Márcio, as minhas sobrinhas Nicole e Lauren, ao meu noivo Gustavo, com eles aprendo a cada dia o significado do verbo amar.

Muito obrigada por tê-los como minha família nessa reencarnação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos espíritos de luz que me ajudaram a chegar até aqui, apoiando-me nas horas difíceis e acalentando o meu coração. Aos amigos espirituais, e aos familiares que já se foram, que não se cansam de emanar energias positivas auxiliando o meu viver. À minha avó Luzia, que do mundo espiritual sempre me ajudou com bons conselhos e inspirações, um dia gostaria de ser como você.

À minha amada família. O ano em que eu passei fora do país me fez sentir que o amor ultrapassa as barreiras da distância e do tempo, somente se fortalecendo. Muito obrigada pela oportunidade de tê-los como meus familiares nessa reencarnação, com vocês a cada dia exercito a paciência, a resignação, o perdão e o desapego. Gostaria de um dia ser tão forte e perspicaz quanto o meu pai ou amorosa e persistente como a minha mãe. Agradeço a meus pais por ser o melhor exemplo de família que eu poderia ter. Gostaria de agradecer à minha irmã Viviane, tua coragem diante à vida me inspira. Ao meu cunhado Paulo, sempre disponível para ajudar. Ao meu irmão Márcio, ensinou-me a virtude da compreensão. Às minhas amadas sobrinhas e afilhadas, Nicole e Lauren. À minha sogra Clarcy, obrigada por ter me acolhido como filha. Ao meu amado noivo Gustavo, “meu gurizinho”, obrigada pelo seu amor sem limites, obrigada por ser meu companheiro nessa existência. Muito obrigada família, por me amar e me apoiar em tudo!

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram na realização dessa conquista. As pessoas entram em nossas vidas permanecendo por um determinado período ou pela vida inteira e deixam marcas. Cada tipo de marca deixada é um tipo de aprendizado diferente. Agradeço a todos que colaboraram ao longo de minha vida. Aos meus amigos de infância, do ensino médio (“as Rondonetes”), do curso técnico em Enfermagem, do hospital “Gracinha”, da faculdade. Aos colegas do laboratório da Prof^a Carla Dalmaç, principalmente à Danusa e Carine. Aos meus amigos de longa data Leonardo Crema e Luísa Diehl. Aos amigos feitos durante minha estada nos Estados Unidos, Fátima, Sônia, Tania, Elaheh, Niyati, Kavita. Aos meus amigos da Sociedade Espírita a União Faz a Força, principalmente, Vali, Paulo Ricardo, Denise, Alaul. Muito obrigada, amigos.

À minha orientadora Patrícia Pelufo, muito obrigada pela oportunidade, muito obrigada pela compreensão, carinho e cuidado, tu és o exemplo de profissional que eu quero ser um dia. Gostaria de agradecer a Prof^a Carla Dalmaç e a Prof^a Denise Zancan. Aos meus orientadores no Doutorado sanduíche professores Michael Ross e Mina Desai. À equipe da Unidade de

Experimentação Animal (UEA/HCPA), à equipe do Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP/HCPA).

Aos meus colegas do grupo DOHAD – Porto Alegre, especialmente à Tania, muito obrigada pela ajuda amiga em todas as horas. À Roberta Dalle Molle, obrigada por todo o apoio durante esses anos de caminhada. Ao Márcio, obrigada por sempre estar disponível para ajudar. À Amanda, sempre com uma palavra amiga. Ao Fábio, ao Adolfo, à Pati Miguel. O meu muito obrigada!!!!

Aos órgãos de pesquisa por terem viabilizado este trabalho (CNPq, CAPES, FAPERGS). À University of California - Los Angeles, Los Angeles Biomedical Research Institute at Harbor-UCLA Medical Center, ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, pela oportunidade.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.
E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.
E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.
O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.
Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal; Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade; Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta....”

(Coríntios capítulo 13, atribuído a Paulo de Tarso)

RESUMO

Introdução: Evidências sugerem que alterações no ambiente intrauterino afetam o persistentemente o desenvolvimento de diferentes órgãos e sistemas de modo a programar o risco para doenças crônicas ao longo da vida. A restrição de crescimento intrauterino (RCIU) é associada com o aumento da preferência pelos alimentos palatáveis e risco para doenças metabólicas na vida adulta. Níveis alterados de insulina no ambiente fetal encontrados em indivíduos que sofreram RCIU podem modificar a formação das vias associadas ao prazer e recompensa (sistemas opioide e dopaminérgico), modificando o comportamento alimentar. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis alterações na resposta frente ao alimento palatável em animais submetidos à RCIU. **Metodologia:** No dia 10 de gestação ratas Sprague-Dawley receberam dieta à vontade (AdLib), ou dieta restrição de 50% (FR). No nascimento, houve adoção cruzada dos filhotes, gerando os grupos (gestação/lactação): AdLib/AdLib (Controles) e FR/AdLib (Restrição de Crescimento Fetal - FR). No estudo 1, foi avaliada a resposta hedônica dos animais em 2 momentos (nas primeiras 24h de vida e aos 90 dias de vida). Em ambas as idades os ratos receberam solução de sacarose ou água destilada e as respostas hedônicas faciais exibidas em 60 segundos foram analisadas. No estudo 2, na idade adulta (ratos machos ao redor dos 80 dias de vida) foi avaliado o consumo de dieta hiperpalatável e o nível de organização do comportamento alimentar usando o BioDAQ®, assim como a liberação de dopamina frente à ração padrão ou alimento palatável foi mensurada pela cronoamperometria no núcleo accumbens (NAcc), com ou sem o uso prévio de insulina sistêmica (5UI/kg). **Resultados:** Estudo 1; nos filhotes a resposta hedônica foi maior nos animais FR expostos a sacarose em comparação a água, sem diferenças nos filhotes do grupo controle. Houve diminuição na fosforilação do receptor mu opioide nos filhotes FR comparados aos controles. Na vida adulta, a resposta hedônica e a fosforilação mu opioide não foram diferentes entre os grupos, sugerindo que as alterações da resposta hedônica e a fosforilação mu opioide observadas no primeiro dia de vida não persistem. No estudo 2, existiu uma interação entre grupo e período do dia em relação ao consumo de ração hiperpalatável, os animais FR comeram mais ração hiperpalatável do que os controles no período ativo (ciclo escuro), e o padrão alimentar apresentou uma maior entropia (consumo imprevisível e fragmentado) no grupo FR neste ciclo. Existiu um atraso na liberação de dopamina no grupo FR em resposta ao Froot Loops® (tempo para a dopamina alcançar o pico máximo), mas não em resposta a ração padrão. O tratamento com insulina reverteu a diferença observada entre os grupos na resposta ao Froot Loops®. Western Blotting mostrou que SOCS3 diminuiu na área tegmentar ventral (VTA) dos FR; pTH/TH aumentou no NAcc de FR, como previamente demonstrado, mas similarmente aos achados da cronoamperometria, estas diferenças foram revertidas pela insulina. **Conclusão:** Há alteração da resposta hedônica no primeiro dia de vida em animais RCIU, juntamente de modificações na fosforilação de receptores opioides, e estas diferenças não persistem na vida adulta. A RCIU altera a sensibilidade à insulina no VTA e consequentemente leva à modulação diferencial do sistema dopaminérgico, o que se reflete no padrão e preferência alimentar em machos adultos. A RCIU induz a alterações nos níveis de insulina possivelmente modificando a funcionalidade das vias hedônicas opioide e dopaminérgica. A RCIU programa alterações neurocomportamentais, afetando o comportamento alimentar, persistentes ao longo da vida que podem colaborar com o desenvolvimento da síndrome metabólica a longo prazo.

Palavras chave: restrição de crescimento intrauterino, dopamina, opioide, recompensa, comportamento alimentar.

ABSTRACT

Introduction: Evidence suggests that alteration in the intrauterine environment persistently affects the development of different organs and systems and programs the risk for chronic diseases throughout the life. Intrauterine growth restriction (IUGR) is associated with increased preference for palatable foods and risk to metabolic disease in adulthood. Altered insulin levels in fetal environment in individuals who suffer IUGR can modify the development of the pathways associated with pleasure and reward (opioid and dopaminergic system), modifying eating behavior. The aim of this study was to evaluate possible changes in the brain response to palatable food in animals submitted to IUGR. **Methods:** At gestation day 10, Sprague-Dawley dams are assigned to receive *ad libitum* diet (AdLib) or 50% restricted diet (FR). At birth, pups were cross-fostered generating two groups (pregnancy/lactation): AdLib/AdLib (Controls) and FR/Adlib (Intrauterine growth restriction - FR). In the Study 1 the hedonic response of the animals was evaluated in 2 moments (24 hours after birth and at 90 days of life). In both ages, rats received sucrose solution or water and the hedonic facial responses exhibited within 60 sec were analyzed. The Study 2, in adulthood (male rats around 80 days of life) the palatable food consumption was evaluated and feeding behavior entropy was assessed using the BioDAQ®. The dopamine release facing standard chow and palatable food was measured by chronoamperometry recordings in nucleus accumbens (NAcc), with or without previous systemic insulin treatment (5UI/kg). **Results:** In the Study 1, pups' hedonic responses were higher in FR pups exposed to sucrose as compared to water, without differences in Control pups. There was decreased phosphorylation of the mu opioid receptor in FR pups compared to Controls. In adult life, hedonic responses and mu opioid phosphorylation were not different between groups, suggesting that the alterations in hedonic response and in mu opioid phosphorylation observed in early life do not persist. In the Study 2, there was an interaction between group and time of the day on the palatable food consumption, FR rats eat more palatable foods than the Control group in the active period (dark cycle), and the eating pattern has a higher entropy (unpredictable and fragmented consumption) in the FR group in this cycle. There was a delayed dopamine release in the FR group in response to Froot Loops® (time to reach the peak dopamine release), but not in response to standard chow. Insulin treatment reverted the difference observed between groups in the dopamine (DA) response to Froot Loops®. Western blot showed that SOCS3 was decreased in the ventral tegmental area (VTA) of FR; pTH/TH was increased in the NAcc of FR, as we have previously shown, but similarly to the chronoamperometry findings, these differences was reverted by insulin. **Conclusion:** There is an alteration in the hedonic response to sucrose in the first day of life in IUGR animals, together with modifications in opioid receptor phosphorylation, and these differences do not persist in adult life. IUGR alters insulin sensitivity in VTA and consequently leads to a differential dopaminergic modulation by insulin, which is reflected in the pattern and food preference in adult males. IUGR induces alterations in insulin levels possibly modifying the functionality of the opioid and dopaminergic hedonic pathways. IUGR programs neurobehavioral changes, affecting eating behavior, persistently throughout life that may contribute to the development of metabolic syndrome in the long term.

Keywords: intrauterine growth restriction, dopamine, opioid, reward, eating behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama representando a hipótese do fenótipo poupador (modificado Hales, Barker, 2001).	17
Figura 2	Diagrama representando a hipótese do fenótipo poupador mostrando diferentes e consequências da restrição de crescimento fetal intrauterino (modificado Hales, Barker, 2001).	17
Figura 3	Adaptação de Gugusheff (2015) esquema de ativação da via da recompensa de Nestler (2005).	32
Figura 4	Hipótese da Tese.	35
Figura 5	Resumo da teoria geral desta Tese.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	giro cingulado
ADHD	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
AgRP	peptídeo relacionado ao gene Agouti
AKT	proteína cinase B
ARC	núcleo arqueado
ASST	<i>Attentional Set-Shifting Task</i> - Teste de flexibilidade cognitiva
CART	peptídeo relacionado à cocaína e anfetamina
CCK	colecistocinina
CPP	<i>Conditioned Place Preference</i> - Teste de preferência condicionada por lugar
CRH	hormônio liberador de corticotropina
DAT	transportador de dopamina
DHM	hipotálamo dorsomedial
D1	receptor de dopamina do tipo 1
D2	receptor de dopamina do tipo 2
D3	receptor de dopamina do tipo 3
D4	receptor de dopamina do tipo 4
D5	receptor de dopamina do tipo 5
DA	dopamina
DAMGO	(d-Ala(2),N-Me-Phe(4),Gly(5)-ol]-encefalina)
DAT	transportador de dopamina
DHM	hipotálamo dorsomedial
DOHaD	<i>Development Origins of Health and Disease</i> - Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença
DOP	receptor delta opioide
fMRI	ressonância magnética funcional
FR	<i>food restriction</i> - restrição alimentar
GABA	ácido gama aminobutírico
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i> - peptídeo semelhante a glucagon 1
GPPG	Comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCPA	Hospital de Clínicas de Clínicas de Porto Alegre

HF	dieta hiperlipídica
IMC	índice de massa corporal
KOP	receptor kappa opioide
LA BioMed	<i>Los Angeles Biomedical Research Institute</i>
LHA	hipotálamo lateral
MCH	hormônio concentrador de melanina
MC3	receptor de melanocortina 3
MC4	receptor de melanocortina 4
MOP	receptor mu opioide
NAcc	núcleo accumbens
NPY	neuropeptídeo Y
NTS	núcleo do trato solitário
OFC	córtex orbitofrontal
pAKT	fosfo-proteína cinase B
PET	tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PFC	córtex pré-frontal
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
POMC	pró-opiomelanocortina
pTH	fosfo-tirosina hidroxilase
PVN	núcleo paraventricular
PYY	peptídeo YY
RCIU	restrição de crescimento intrauterino
SIRT1	sirtuína do tipo1
SN	substância nigra
SOCS3	supressor de sinalização de citocina do tipo 3
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SN	substância nigra
TH	tirosina hidroxilase
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	hormônio estimulante da tireóide
UEA-HCPA	Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UCLA	<i>University of California, Los Angeles</i>

UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VHM	núcleo ventromedial
VP	pálido ventral
VTA	área tegmentar ventral
α -MSH	α -hormônio estimulador de melanócito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença – DOHaD.....	15
1.2 Restrição de Crescimento Intrauterino (RCIU).....	18
1.3 Regulação do comportamento alimentar.....	19
1.3.1 Sinais periféricos de regulação do comportamento alimentar.....	19
1.3.2 Regulação central do comportamento alimentar.....	20
1.3.2.1 Controle homeostático.....	21
1.3.2.2 Influência das funções executivas no comportamento alimentar: tomada de decisão e controle inibitório.....	22
1.3.2.3 Controle hedônico.....	25
1.3.2.3.1 Sistema opioide.....	26
1.3.2.3.2 Sistema dopaminérgico.....	27
1.4 Restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e comportamento alimentar.....	32
2 HIPÓTESE.....	35
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MÉTODOS E RESULTADOS.....	37
4.1 CAPÍTULO I: Artigo - LAUREANO DP, DALLE MOLLE R, ALVES MB, LUFT C, DESAI M, ROSS MG, SILVEIRA PP. Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet taste in newborn pups - Role of the accumbal μ -opioid receptors. <i>Neuroscience</i> . 2016; 322:500-8.....	37
4.2 CAPÍTULO II: Carta - LAUREANO DP, DALLE MOLLE R, PORTELLA AK, SILVEIRA PP. Facial Expressions in Small for Gestational Age Newborns. <i>Journal of Child Neurology</i> JCR , v. 31, p. 398-3.....	47

4.3 CAPÍTULO III: Artigo - DP LAUREANO, MB ALVES, PM MIGUEL, TD MACHADO, AR REIS, AB MUCCELLINI, FDAS CUNHA, C LAMPERT, APA SALVADOR, R DALLE MOLLE, PR MOSCA, I POKHVISNEVA, M DESAI, MG ROSS, PP SILVEIRA. Intrauterine growth restriction modifies the accumbal dopaminergic response to palatable food intake. A ser submetido.....	50
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....	81
APÊNDICE A.....	103
APÊNDICE B.....	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença - DOHaD

Embora várias evidências da literatura já apontassem para uma associação entre a qualidade do ambiente intrauterino e a saúde a longo prazo, a idéia central que gerou a linha “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD, do inglês *Development Origins of Health and Disease*)” foi organizada e proposta por David Barker na metade da década de 1980. Também chamada de Origem fetal das doenças do adulto, ou Hipótese de Barker (Barker *et al.*, 2002), afirma que os fatores ambientais, principalmente relacionados à nutrição, agem no início da vida de modo a programar o risco para doenças crônicas ao longo da vida.

Diferentes tipos de malnutrição durante a gestação sinalizam ao bebê que o ambiente em que ele viverá será adverso ou escasso em nutrientes. O organismo do bebê responde a esse ambiente hostil se adaptando, por exemplo, reduzindo o peso corporal e alterando o metabolismo de modo a estocar o máximo de energia possível e garantir a sobrevivência (Barker, 2006; Bateson, Martin, 1999). Como o período perinatal humano apresenta uma alta plasticidade, adaptando-se ao ambiente (West-Eberhard, 1989), essa resposta adaptativa “programa” o indivíduo e persiste a longo prazo, de forma que o organismo continuará estocando/poupando energia ao longo da vida, mesmo quando não há mais escassez. Essa é a explicação da Teoria do Fenótipo Pougador, uma das bases da Hipótese de Barker. Esta hipótese tem sido apoiada por uma série de estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais que demonstram a associação entre a perturbação do ambiente nutricional precoce e maior risco para doenças cardiovasculares em adultos (Barker *et al.*, 2002). Além disso, há maior riscos para aumento na adiposidade central, perfil lipídico aterogênico (Laurén *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004), redução da massa óssea e conteúdo mineralósseo (Szathmari *et al.*, 2000; Dennison *et al.*, 2005; Laitinen *et al.*, 2005; Hovi *et al.*, 2009), resposta diferenciada ao estresse (Jones *et al.*, 2007; Kajantie, Raikkonen, 2010) e padrões alterados de secreção hormonal (Painter *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2006).

Estudos de Hales e Barker demonstram a relação entre a exposição à escassez calórica intrauterina e o desenvolvimento de síndrome metabólica na vida adulta (figuras 1 e 2) (Hales *et al.*, 1991; revisado por Hales, Barker, 1992; revisado por Hales, Barker, 2001). A pobre nutrição fetal leva ao desenvolvimento deficitário das células β pancreáticas (incluindo possivelmente a vasculatura e inervação das ilhotas de Langerhans). Outros trabalhos corroboram com esse achado demonstrando que roedores que receberam dieta pobre em

proteína durante a gestação exibem reduzida vascularização no pâncreas, conseqüentemente interferindo na homeostase da glicose ao longo da vida (Dahri *et al.*, 1995; Snoeck *et al.*, 1990). Esta alteração nas células β pancreáticas leva a um controle da glicemia deficiente (revisado por Hales, Barker, 1992), diminuindo a tolerância à glicose e aumentando as chances do desenvolvimento de diabetes tipo 2 na vida adulta (revisado por Green *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 1993; Eriksson *et al.*, 2002; revisado por Whincup *et al.*, 2008). A insulina parece ser uma peça chave na regulação do crescimento fetal (revisado por Hales, Barker, 1992; revisado por Fowden 1992; Philipps *et al.*, 1991). Logo, o déficit de insulina circulante causado pela pobre nutrição fetal afeta o desenvolvimento de vários órgãos, entre eles os rins, modificando a elasticidade dos vasos e alterando função renal bem como diminuindo o número de néfrons (Bauer *et al.*, 2002; Hinchliffe *et al.*, 1992; Schreuder *et al.*, 2006), o que pode colaborar ao desenvolvimento de hipertensão na idade adulta (Barker *et al.*, 1989; Barker *et al.*, 1993). O organismo tenta se adaptar ao ambiente nutricional hostil, preservando o crescimento de órgãos chave/vitais como o encéfalo, no entanto muda permanentemente seu funcionamento e estrutura (revisado por Hales, Barker, 2001). O funcionamento do sistema nervoso então é afetado, podendo levar a alterações comportamentais ou distúrbios psiquiátricos no indivíduo, tais como: depressão (Kajantie, Raikonen, 2010; Rice *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2001; Laursen *et al.*, 2007), transtorno do humor bipolar, transtorno esquizoafetivo (Laursen *et al.*, 2007), esquizofrenia (Abel *et al.*, 2010); desenvolvimento de sintomas relacionados ao Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD)(Lahti *et al.*, 2006; Strang-Karlsson *et al.*, 2008); e alterações no comportamento alimentar (Lussana *et al.*, 2008; Ayres *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2012; Dalle Molle *et al.*, 2015a).

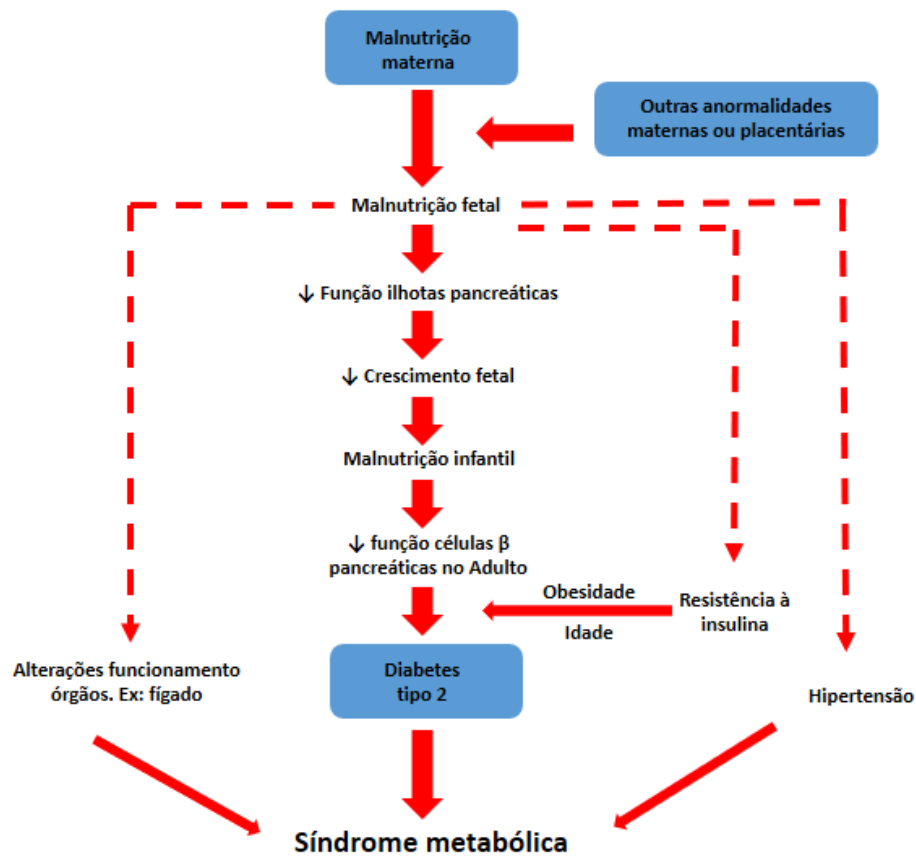


Figura 1: Diagrama representando a hipótese do fenótipo poupador (modificado Hales, Barker, 2001).

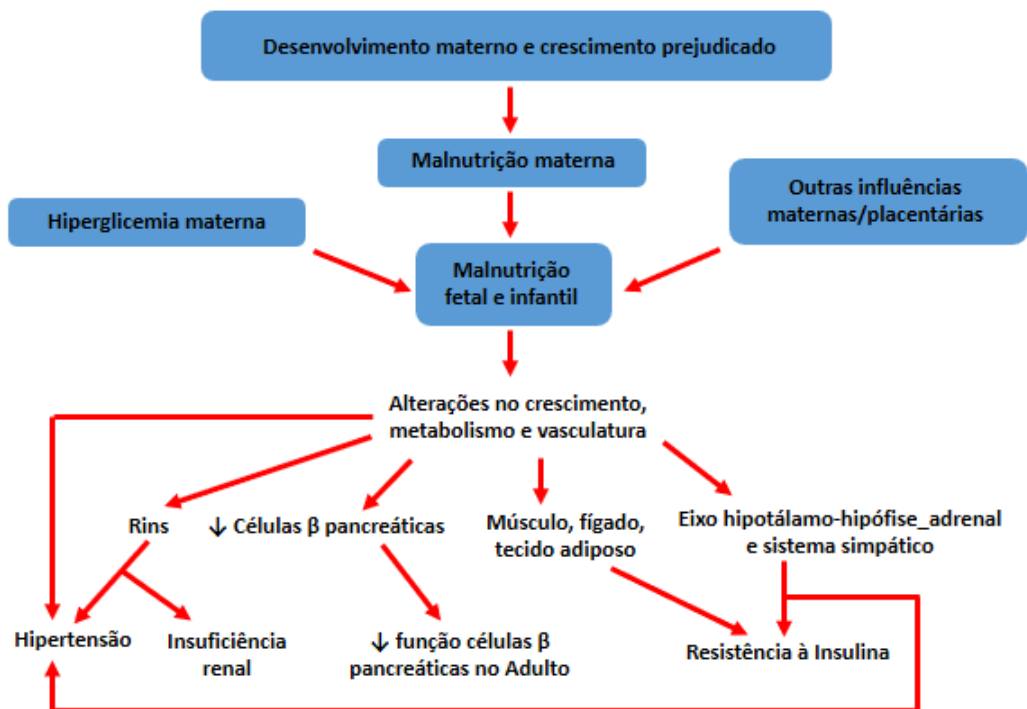


Figura 2: Diagrama representando a hipótese do fenótipo poupador mostrando as diferentes consequências da restrição de crescimento fetal intrauterino (Hales, Barker, 2001).

1.2 Restrição de Crescimento Intrauterino (RCIU)

A restrição de crescimento intrauterino (RCIU) ocorre quando o feto não atinge o tamanho esperado ou determinado pelo seu potencial genético para certa idade gestacional. Embora sua incidência varie muito, dependendo da população estudada e da curva de crescimento utilizada como referência (Peleg *et al.*, 1998), pode-se afirmar que a RCIU é um problema clínico bastante comum, atingindo em torno de 10% a 15% de todas as gestações (Florio *et al.*, 2006) independente do desenvolvimento socioeconômico do país em questão. O crescimento fetal depende de interações entre determinantes genéticos e epigenéticos e o ambiente materno, fetal e influências placentárias (Gardosi *et al.*, 1992). As causas para restrição de crescimento intrauterino são diversas e incluem alterações nutricionais, doenças crônicas maternas como hipertensão, obesidade e diabetes, infecções, uso de drogas, fatores metabólicos e desordens da placenta (Scifres; Nelson, 2009). A RCIU está associada à natimortalidade e morbidade perinatal assim como efeitos a longo prazo como paralisia cerebral e doenças na idade adulta (Figueras; Gardosi, 2011).

Em países desenvolvidos, o pobre crescimento fetal é mais provável que seja uma consequência de insuficiência placentária, idade materna avançada ou tabagismo materno do que a má nutrição materna, ao passo que nos países em desenvolvimento, a restrição de crescimento intrauterino (RCIU) é mais provável ser em consequência da má qualidade nutricional materna antes ou doenças crônicas durante a gravidez (Morrison *et al.*, 2010). Além do mais, a tecnologia pode influenciar a incidência de RCIU, uma vez que o advento da reprodução assistida aumentou o risco de bebês nascerem pequenos para idade gestacional ou paradoxalmente, grandes para idade gestacional (Waterland, Michels, 2007). No entanto, é importante ressaltar que independente da causa, a “mensagem” transmitida ao feto através da placenta é de que ele irá crescer num ambiente escasso e hostil, o que estimula uma série de adaptações para garantir a sobrevivência até a idade reprodutiva e não muito além disso (Gluckman; Hanson, 2004).

Estudos mostram que baixo peso ao nascer é um marcador de condições fetais adversas, sendo associado com desordens metabólicas na idade adulta, predizendo resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Barker, 1999), hipertensão (Law *et al.*, 2002), obesidade (Laitinen *et al.*, 2004) e doença cardiovascular (Barker *et al.*, 2005), especialmente em casos onde existe evidência de *catch-up growth* (taxa de crescimento acelerada) durante a infância (Law *et al.*, 2002). Então, padrões de alimentação e ganho de peso acelerados durante o período pós-natal

são mediadores cruciais para o subseqüente risco de obesidade, doenças cardiovasculares (Singhal *et al.*, 2003) e resistência à insulina (Gluckman; Hanson, 2004).

Este estudo se baseia no modelo de restrição de crescimento intrauterino e adoção cruzada de acordo com Desai e colaboradores (2005) no qual submetemos ratos da linhagem Sprague-Dawley à restrição de 50% da quantidade de ração padrão às mães a partir do 10º dia de gestação. Esse modelo é bem estabelecido em nosso laboratório, demonstrando resultados consistentes e relevantes (Dalle Molle *et al.*, 2015a; Alves *et al.*, 2015; Laureano *et al.*, 2016), induzindo má-nutrição intrauterina, mimetizando assim os efeitos da restrição intrauterina “natural” (Cunha *et al.*, 2015). O modelo de RCIU nos permite estudar em detalhes as alterações comportamentais associadas ao crescimento fetal escasso, assim como os mecanismos envolvidos.

1.3 Regulação do comportamento alimentar

1.3.1 Sinais periféricos de regulação do comportamento alimentar

O comportamento alimentar é regulado por fatores periféricos e centrais (Harrold *et al.*, 2012). Os fatores periféricos envolvidos são tipicamente liberados como consequência da ingestão alimentar (Harrold *et al.*, 2012).

Entre os fatores periféricos de regulação do comportamento alimentar estão os sinais de saciedade (Harrold *et al.*, 2012, Young, 2012), gerados no trato gastrointestinal durante uma refeição, que regulam a ingestão alimentar induzindo a sensação de plenitude. Depois da entrada no lúmen gastrointestinal, os nutrientes estimulam a atividade vagal e vias simpáticas aferentes para o núcleo do trato solitário (NTS), no tronco cerebral. Além disso, os nutrientes provocam a secreção de vários peptídeos, entre eles a colecistocinina (CCK), peptídeo semelhante a glucagon 1 (*Glucagon-like peptide-1*, GLP-1), peptídeo YY (PYY) e amilina (Harrold *et al.*, 2012; Woods, 2004).

Os sinais de fome são gerados durante a fase cefálica (se refere a respostas fisiológicas iniciadas pela visão ou cheiro da comida), o contato com estímulos sensoriais relacionados ao alimento, e transmitem sinais para o cérebro através de fibras aferentes primárias olfativas, gustativas e pares cranianos (I, V, VII, IX e X) (Harrold *et al.*, 2012). Alterações na glicemia sanguínea podem fornecer o sinal para o início de uma nova refeição, a detecção das mesmas ocorre centralmente em diferentes locais do rombencéfalo ao hipotálamo (Levin, 2002,

Campfield, Smith, 2003). Estas áreas do cérebro, juntamente com sensores de glicose periféricos, representam uma rede que controla a disponibilidade da glicose. A disponibilidade de glicose influencia a expressão e metabolismo de vários neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos (Levin, 2006; Harrold *et al.*, 2012).

Sinais de adiposidade são produzidos por hormônios secretados no sangue em proporção direta à quantidade de gordura corporal armazenada (Woods, 2004). Os mais conhecidos sinais de adiposidade são a insulina e a leptina. A insulina é secretada pelas células β pancreáticas em resposta ao aumento de glicose (Bagdade *et al.*, 1967; Polonsky *et al.*, 1988). Indivíduos obesos apresentam maiores níveis de insulina basal e em resposta ao alimento comparado a indivíduos magros (Polonsky *et al.*, 1988). Receptores de insulina e leptina são expressos pelos neurônios envolvidos no balanço energético, a administração de ambos os hormônios no encéfalo diminui a ingestão alimentar (Schwartz *et al.*, 2000), ou seja, ambos são considerados hormônios anoréticos liberados durante o estado pós-prandial. A leptina é secretada pelos adipócitos em proporção direta à quantidade de gordura corporal armazenada (Woods *et al.*, 1998). A ativação destes neurônios leva a redução da atividade de neurônios do peptídeo relacionado ao gene Agouti (AgRP)/neuropeptídeoY (NPY) e ativação de neurônios pró-opiomelanocortina (POMC). Consequentemente o α -hormônio estimulador de melanócito (α -MSH) se liga a receptores de melanocortina 3 e 4 (MC 3 e 4 respectivamente) em células do hormônio concentrador de melanina (MCH) no hipotálamo lateral para reduzir a ingestão alimentar e com o hormônio estimulante da tireoide (TSH) e o hormônio liberador da corticotropina (CRH) no núcleo paraventricular, aumentam o gasto energético (Abizaid, Horvath, 2008).

1.3.2 Regulação central do comportamento alimentar

O comportamento alimentar humano é regulado centralmente pelas vias homeostática e hedônica, e pelas funções executivas (principalmente pela tomada de decisão e pelo controle inibitório) (revisado por Harrold *et al.*, 2012; revisado por Portella, Silveira, 2014). O controle homeostático do apetite é mediado pela necessidade biológica de manutenção corporal dos depósitos de reservas energéticas (Harrold *et al.*, 2012). Por outro lado, o controle hedônico do apetite é mediado pelo prazer e sensação de recompensa envolvida no consumo de alimentos

palatáveis. Já as funções executivas estão relacionadas à escolha alimentar (revisado Dohle *et al.*, 2017).

1.3.2.1 Controle homeostático

O hipotálamo controla o balanço energético homeostático corporal. Populações de neurônios hipotalâmicos regulam a ingestão alimentar (Van de Sande-Lee *et al.*, 2012), tendo esta estrutura um papel central no controle da fome e da saciedade (Harrold *et al.*, 2012).

O núcleo arqueado (ARC) atua como centro do controle da ingestão alimentar e integra sinais hormonais para a homeostase energética (Funahashi *et al.*, 2000). A área do ARC – eminência mediana é um dos órgãos circumventriculares onde a barreira hematoencefálica é permeável permitindo a entrada de peptídeos periféricos e proteínas (Friedman, Halaas, 1998; Lent, 2010), sinalizando o estado nutricional (Harrold *et al.*, 2012, Horvath *et al.*, 2004). Ele contém populações neuronais que expressam neuropeptídeos orexigênicos, NPY e AgRP (Harrold *et al.*, 2012). O mesmo também contém neurônios anorexigênicos que expressam o gene da POMC e o peptídeo relacionado à cocaína e anfetamina (CART) (Elias *et al.*, 1998), sendo assim um sítio privilegiado que recebe sinais químicos e físico-químicos do organismo que orientam a sua função (Lent, 2010; Horvath *et al.*, 2004), integrando sinais hormonais e a homeostase energética (Arora, Anubhuti, 2006).

O núcleo paraventricular (PVN) integra sinais de muitas vias neuronais importantes na regulação do balanço energético (Abizaid, Horvath, 2008). O PVN é o principal local de liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (Arora, Anubhuti, 2006). Numerosas vias neuronais envolvidas no balanço energético convergem no PVN, incluindo projeções de neurônios que expressam NPY do ARC, orexinas, hormônio estimulador de melanócito (α -MSH) (derivado da clivagem da POMC) e o estimulante do apetite galanina (Arora, Anubhuti, 2006; Elmquist *et al.*, 1998; Elmquist *et al.*, 1999).

O hipotálamo dorsomedial (DHM), tem extensivas conexões com outros núcleos hipotalâmicos mediais e o hipotálamo lateral, e acredita-se que tenha um papel integrador no processamento de informações a partir de populações neuronais desses sítios (Elmquist *et al.*, 1998).

O núcleo ventromedial (VHM) foi identificado como alvo chave da leptina, onde ela atua inibindo a alimentação, estimulando o gasto de energia e causando perda de peso (Williams

et al., 2000; Satoh *et al.*, 1997). Lesões no VMH ou PVN produz a síndrome da hiperfagia e obesidade (Satoh *et al.*, 1997).

O hipotálamo lateral (LHA) tem uma menor densidade de corpos celulares, expressando o hormônio concentrador de melanina (MCH) e as orexinas (hipocretinas). Também contém fibras que se projetam para, e são originadas de estruturas do tronco cerebral responsáveis por várias funções viscerais, discriminação do paladar e distensão gástrica (núcleo do trato solitário e núcleo parabraquial) (Bernardis; Bellinger, 1996; Williams *et al.*, 2000). A parte perifornical do hipotálamo lateral (LHA) envolve o feixe longitudinal de fibras do fórnix, contendo alta densidade de receptores NPY (Williams *et al.*, 2000). As hipocretinas/orexinas se projetam para o ARC, fazendo sinapse com as células NPY/AgRP, acredita-se que este circuito tenha um papel importante na ingestão de alimentos induzida pela hipocretina/ orexina (Horvarth *et al.*, 1999).

1.3.2.2 Influência das funções executivas no comportamento alimentar: tomada de decisão e controle inibitório

Funções executivas, também chamadas de controle executivo ou cognitivo se referem a uma família de processos essenciais para a função mental de ordem superior (revisado por Diamond, 2013; revisado por Logue, Gould, 2014). De forma geral, estão relacionadas à capacidade do sujeito de engajar-se em comportamentos orientados a objetivos, ou seja, à realização de ações voluntárias, independentes, autônomas, auto organizadas e orientadas para metas específicas (revisado por Capovilla, 2007). Os processos envolvidos na função executiva incluem: memória de trabalho, atenção, flexibilidade cognitiva, controle inibitório, planejamento, julgamento e tomada de decisão (revisado por Logue, Gould, 2014; revisado por Portella, Silveira, 2014). Esses comportamentos envolvem múltiplas redes neurais incluindo o tálamo, gânglio basal e córtex pré-frontal (PFC) (revisado por Willcutt *et al.*, 2005) e são modulados por neurônios dopaminérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos (revisado por Logue, Gould, 2014).

Muitos distúrbios psiquiátricos são caracterizados por alterações na função cognitiva: esquizofrenia, distúrbio bipolar, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD), comportamento antissocial, transtorno obsessivo compulsivo, abuso de substâncias (revisado por Brower, Price 2001; revisado por Cavedini *et al.*, 2006; revisado por Daban *et al.*, 2006; revisado por Schoenbaum *et al.*, 2006; revisado por Willcutt *et al.*, 2005). Um famoso caso

sobre déficit na função executiva descrito na literatura médica foi de Phineas Gage que após um acidente na construção de uma via férrea, seu local de trabalho, uma barra de ferro de mais de 1 metro de comprimento e 3 centímetros de diâmetro perfurou o seu crânio. Após o acidente ele apresentou alterações dramáticas em sua personalidade, tornando-se irreverente, instável, grosseiro, irresponsável e sem respeito pelas normas sociais. Foi constatado que o dano no lobo frontal de Phineas Gage afetou funções executivas do mesmo, entre elas na tomada de decisão (Damasio *et al.*, 1994).

A tomada de decisão refere-se ao processo mental (ou cognitivo) de seleção lógica para escolher entre as opções disponíveis, avaliando as alternativas com o objetivo de tomar a melhor decisão (revisado por Cavedini *et al.*, 2006; revisado por Swami, 2013). Pacientes com dano em diferentes sub-regiões do córtex pré-frontal (PFC) apresentam piora em uma variedade de tarefas que exigem escolha entre um alto valor monetário imediato, mas grande perda futura, e menor ganho monetário com pequena perda futura (revisado por Floresco; Magyar 2006), apresentando déficit na tomada de decisão. A projeção mesotelencefálica da dopamina ao córtex pré-frontal (PFC) exerce importante controle neuromodulador sobre funções mnemônicas mediadas pelos lobos frontais (revisado por Floresco; Magyar 2006). A transmissão dopaminérgica no PFC está envolvida com o processo de tomada de decisão, controle inibitório, memória de trabalho, flexibilidade cognitiva e tarefas com recompensa em ratos (Floresco; Magyar, 2006; Kheramin *et al.*, 2004; Winstanley *et al.*, 2006).

O controle inibitório envolve a habilidade em controlar a atenção, comportamento, pensamentos, e/ou emoções substituindo uma forte predisposição interna ou atração externa, e ao invés disso fazer o que é mais apropriado ou necessário (revisado por Diamond, 2013). Sem o controle inibitório nós ficamos à mercê dos impulsos, à hábitos (respostas condicionadas), ou estímulos ambientais que te levam à determinada ação (revisado por Diamond, 2013).

As funções executivas estão envolvidas no comportamento alimentar, especialmente quando os indivíduos estão realizando algum tipo de dieta. Por exemplo, realizar uma dieta requer planejamento das refeições, tomar decisões quanto a seleção dos tipos de alimentos, detectar variações, preparar a dieta (comprar os alimentos e preparar os mesmos), superar os hábitos não saudáveis e resistir à tentação de ingerir alimentos hiperpalatáveis (Dohle *et al.*, 2014; Dohle, Siegrist, 2016; Allan *et al.*, 2011; revisado por Allan *et al.*, 2016; Hartmann *et al.*, 2013).

A tomada de decisão influencia diretamente nas escolhas alimentares do indivíduo (revisado por Van Meer *et al.*, 2016). O comportamento de escolha alimentar pode ser dividido em três tópicos relevantes para o entendimento do mesmo: preferência alimentar, sensibilidade

a estímulos ambientais relacionados a alimentos e capacidade de autocontrole (revisado por Van Meer *et al.*, 2016). A preferência alimentar influencia na escolha do alimento, bem como no consumo do mesmo, podendo levar a hábitos alimentares não saudáveis. Indivíduos obesos apresentam maior preferência por alimentos ricos em gordura e açúcar (Drewnowski *et al.*, 1992; revisado por Dressler, Smith, 2013; revisado por Reed *et al.*, 1997). A preferência por alimentos hiperpalatáveis leva ao risco do comer em excesso (revisado por Van Meer, 2016). Outro tópico que influencia na tomada de decisão são os estímulos alimentares ou dicas externas. As dicas podem ser extremamente diretas (por exemplo, ver alguém comendo um hambúrguer) ou menos diretas (ver um hambúrguer em um comercial na televisão) (Bailey, 2017). Existem também dicas relacionadas às técnicas de marketing, representações da marca, com o uso de símbolos ou logotipos (Bailey, 2017). As características da embalagem bem como rótulo do produto podem influenciar na escolha do mesmo. O rótulo frontal do produto pode encorajar ou desencorajar a ingestão baseado no conteúdo nutricional (Hamlin *et al.*, 2015; Koenigstorfer *et al.*, 2014). A alimentação externa é uma medida psicológica que reflete a predisposição para comer após a exposição a alimentos no ambiente e dicas alimentares (Paquet *et al.*, 2017; revisado por Herman, Polivy, 2008). A capacidade de autocontrole também influencia na tomada de decisão, ela refere-se à habilidade de conter uma resposta com uma recompensa imediata em favor de uma resposta com um resultado que é mais vantajoso a longo prazo (revisado por Van Meer *et al.*, 2016). O autocontrole é importante para a escolha alimentar saudável, assim como a falta dele pode resultar em escolhas alimentares não saudáveis e superconsumo (revisado por Van Meer *et al.*, 2016). Estudos demonstram que o autocontrole é negativamente relacionado ao peso corporal (Weller *et al.*, 2008; Gunstad *et al.*, 2007; Hagger *et al.*, 2013).

No comportamento alimentar, o controle inibitório é relacionado à habilidade de o indivíduo inibir o consumo de alimentos saborosos com alto valor calórico, hiperpalatáveis (revisado por Dohle *et al.*, 2017). A impulsividade está relacionada à preferência por alimentos palatáveis, a menor resposta inibitória é associada aumento da vulnerabilidade a comer em excesso, sobrepeso e obesidade (Houben *et al.*, 2014; Allan *et al.*, 2010; Guerrieri *et al.*, 2008; Hofman *et al.*, 2014; Nederkoorn *et al.*, 2006; Nederkoorn *et al.*, 2007; Nederkoorn *et al.*, 2009; Nederkoorn *et al.*, 2010). O pobre controle inibitório é relacionado a hábitos alimentares não saudáveis (Guerrieri *et al.*, 2007, Houben *et al.*, 2014), e o aumento do mesmo é associado com a menor frequência de consumo de alimentos ricos em gordura (Hal, 2012). Foi demonstrado que indivíduos com diminuição do controle inibitório comem menos vegetais e frutas e mais

lanches (Allan *et al.*, 2011), esse déficit inibitório pode ser relacionado ao aumento do índice de massa corporal (IMC) e mudanças nas respostas alimentares (Houben *et al.*, 2014). Alterações na sinalização dopaminérgica cortical modificam as funções executivas, controle inibitório e tomada de decisão, e as mesmas influenciam na escolha alimentar do indivíduo (Colzato *et al.*, 2009; revisado por Rogers, 2011; Alves *et al.*, 2015).

Os indivíduos diferem em sua suscetibilidade ao sobrepeso possivelmente devido a diferenças na responsividade ao alimento relacionado às dicas sensoriais no ambiente (revisado por Herman, Polivy, 2008). Pessoas com sobrepeso são mais sensíveis a dicas alimentares (revisado por Van Meer *et al.*, 2016), possivelmente apresentando um menor controle inibitório, influenciando assim na tomada de decisão e facilitando o consumo de alimentos não saudáveis.

Indivíduos que nasceram pequenos para idade gestacional apresentam na infância pobre neurodesenvolvimento, déficit na função executiva (Leitner *et al.*, 2007), menor desenvolvimento cognitivo (Watt, 1986; Feldman, Eidelman, 2006) e na vida adulta continuam a apresentar reduzida capacidade cognitiva (Viggedal *et al.*, 2004). Além de apresentar aumento da vulnerabilidade à adição (Franzek *et al.*, 2008) e Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD) ao longo da vida (Heinonen *et al.*, 2010). Alves *et al.*, (2015) demonstrou a relação entre o aumento do consumo de alimento palatável e o conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) em resposta a dicas alimentares em animais submetidos ao protocolo de RCIU. Ratas fêmeas precisam de menos *trials* para atingir o critério no Teste de flexibilidade cognitiva (*Attentional Set-Shifting Task* - ASST) e apresentam aumentos nos níveis de tirosina hidroxilase (TH) no córtex orbitofrontal (OFC). Machos consomem mais alimento palatável na caixa-moradia apresentando uma diminuição de TH no OFC após a exposição ao alimento palatável (Alves *et al.*, 2015). Esse resultado demonstra que, em indivíduos que sofreram RCIU, a sinalização dopaminérgica cortical alterada pode influenciar nas escolhas alimentares (Portella, Silveira, 2014).

1.3.2.3 Controle hedônico

A palatabilidade e o prazer são indiscutivelmente os mais poderosos motivadores da ingestão alimentar, assim a natureza gratificante dos alimentos parece ser capaz de superar o controle homeostático, agindo como um estímulo mesmo na ausência de déficit de energia (revisado por Harrold *et al.*, 2012). O sistema da recompensa é complexo, envolvendo interações entre vários sistemas neuronais (revisado Harrold *et al.*, 2012). Os sistemas opioide

(revisado Harrold *et al.*, 2012) e o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Volkow *et al.*, 2011) estão envolvidos no controle hedônico do apetite.

1.3.2.3.1 Sistema opioide

Os opioides são o grupo mais estudado em relação aos efeitos da recompensa alimentar e palatabilidade (revisado por Fulton, 2010). A morfina é um opioide prototípico e tem sido usado há séculos. Os primeiros relatos do uso reportam ao século II por um médico grego, Galeno, que administrou ópio a pacientes para aliviar a dor e relaxar, a pessoas que sofriam de asma e falência cardíaca congestiva. O ópio é extraído da papoula, *Papaver somniferum*. Em 1806, o químico alemão Serturmer isolou os alcaloides do ópio, deu o nome de *Morphium* em homenagem ao Deus grego dos sonhos *Morpheus*, mais tarde ganhou o nome universal de *Morphine* (revisado por Waldhoer *et al.*, 2004). Mas somente em 1973 foi descrito o primeiro receptor opioide (Pert, Snyder, 1973).

Os opioides são uma família de peptídeos (β -endorfina, encefalina e dinorfina), cada um dos quais é clivado em três pré-pró-peptídeos (pró-opiomelanocortina, proencefalina e prodinorfina, respectivamente), que interagem com receptores das classes MOP (μ = mu para morfina), KOP (κ = kappa para a cetociclazocina), DOP (δ = delta para deferens porque foi identificado pela primeira vez em camundongos nos ductos deferentes ou vas deferens), NOP-R (inicialmente chamado LC132), ORL-1 e nociceptina/orfanina FQ receptor (Lord *et al.*, 1977; Meunier *et al.*, 1995; Akil *et al.*, 1984; Mollereau *et al.*, 1994; Waldhoer *et al.*, 2004).

Os opioides modulam o sistema da recompensa através de sua ação no núcleo accumbens (NAcc) e na área tegmentar ventral (VTA), a administração direta de opioides nessas áreas estimula a ingesta alimentar (Majeed *et al.*, 1986; Mucha, Iversen, 1986). Os receptores mu opioides são um dos principais responsáveis por exercer a influência dos opioides no VTA e estriado estimulando o comportamento alimentar (Bakshi, Kelley, 1993; Noel, Wise, 1993; Zhang, Kelley, 1997). A estimulação dos receptores mu e delta opioides, mas não do kappa aumenta a ingesta alimentar de ração e sacarose, principalmente quando há infusão na porção “shell” do NAcc (Bakshi, Kelley, 1993; Noel, Wise, 1993; Zhang, Kelley, 1997).

Os receptores mu opioides tem alta afinidade por encefalinas e endorfinas e baixa afinidade por dinorfinas (que são seletivas por receptores kappa). Tanto encefalina quanto β -endorfina são liberadas no NAcc e pálido ventral (VP) principalmente em resposta ao alimento palatável. Estudos de Hayward e colaboradores mostraram que encefalina e β -endorfina são opioides endógenos que medeiam as ações relacionadas às propriedades motivacionais do

alimento (Hayward *et al.*, 2002; Hayward *et al.*, 2006; Hayward, Low, 2007). Esses achados mostram a importância do papel dos receptores mu opioides e de seus ligantes, encefalina e β -endorfina, no NAcc e VP nos efeitos da recompensa alimentar e na modulação da palatabilidade (revisado por Fulton, 2010).

Os opioides endógenos são implicados no prazer sensorial gerado pela ingesta alimentar (revisado por Harrold *et al.*, 2012). O consumo de alimento palatável estimula a liberação de β -endorfina no hipotálamo (Dum *et al.*, 1983). Em animais, os antagonistas opioides parecem seletivamente reduzir o consumo de alimento altamente palatável, alimento rico em açúcar e gordura (Cooper, 1983). A administração de naloxona, um antagonista mu opioide, em mulheres com compulsão alimentar (obesas ou com peso normal) reduz a preferência especialmente por alimentos palatáveis. Em animais esse fármaco apresenta o mesmo efeito (Cooper, 1980; Glass *et al.*, 1996; Lynch, Libby, 1983). Similarmente, a naltrexona, outro antagonista mu opioide, reduz a preferência por sacarose em humanos (Fantino *et al.*, 1986). Além de suprimir a hiperfagia induzida pela dieta hiperpalatável em ratos (Apfelbaum, Mandenoff, 1981).

Estudos mostram que a estimulação de receptores mu opioides no shell do NAcc pelo agonista mu opioide DAMGO (d-Ala(2),N-Me-Phe(4),Gly(5)-ol]-encefalina) aumenta o consumo de dieta rica em gordura (Zhang *et al.*, 1998; Zhang, Kelley, 2000). Além do mais, a administração de DAMGO no NAcc estimula neurônios no hipotálamo que expressam orexina que por sua vez através da sinalização do receptor orexina-1 no VTA, que possivelmente interage com outros sistemas motivacionais levando ao aumento da ingestão de alimento palatáveis (Zheng *et al.*, 2007). O aumento do consumo de dieta palatável induzido por DAMGO é mediado pelo ácido gama aminobutírico (GABA), o uso do agonista GABAérgico Muscimol no hipotálamo dorsomedial, hipotálamo lateral, VTA ou região intermediária do núcleo do trato solitário inibe os efeitos de DAMGO no NAcc (Will *et al.*, 2003). Conjuntamente estudos farmacológicos envolvendo os agonistas e antagonistas opioides mostram que os opioides endógenos medeiam a resposta alimentar e a preferência pelo alimento palatável (Drewnowski *et al.*, 1992).

1.3.2.3.2 Sistema dopaminérgico

A Dopamina (DA) é a catecolamina predominante no encéfalo, e é sintetizada por neurônios mesencefálicos na substância nigra (SN) e área tegmentar ventral (VTA) (Baik,

2013a). Existem quatro principais vias dopaminérgicas identificadas em encéfalos de mamíferos são: a nigrostriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (Beaulieu, Gainetdinov, 2011). A via nigroestriatal se projeta da substância nigra ao gânglio basal, é parte do sistema nervoso extrapiramidal (Stahl, 2000; Beaulieu, Gainetdinov, 2011). A via mesolímbica se projeta da área tegmentar ventral do mesencéfalo ao núcleo accumbens, uma parte do sistema límbico envolvido em muitos comportamentos, tais como, prazer, busca de recompensa e drogas de abuso (Stahl, 2000; Beaulieu, Gainetdinov, 2011). A via mesocortical é relacionada à via mesolímbica, e também se projeta da área tegmentar ventral do mesencéfalo, mas envia seus axônios para o córtex límbico (Stahl, 2000; Beaulieu, Gainetdinov, 2011). A quarta via dopaminérgica é a tuberoinfundibular, que controla a secreção de prolactina projetando-se do hipotálamo a glândula pituitária anterior (Stahl, 2000; Beaulieu, Gainetdinov, 2011). Esses neurônios são envolvidos em várias funções vitais do sistema nervoso central, incluindo movimento voluntário, alimentação, emoções, recompensa, sono, atenção, memória de trabalho e aprendizado (Beaulieu, Gainetdinov, 2011). Na periferia a dopamina desempenha um papel importante na regulação do olfato, regulação hormonal, função cardiovascular, processos da retina, regulação simpática, sistema imune e função renal, entre outras (Snyder *et al.*, 1970; Missale *et al.*, 1998; Sibley, 1999; Carlsson, 2001; Iversen, Iversen, 2007).

A dopamina interage com receptores de membrana pertencentes a família de sete receptores acoplados à proteína G do domínio transmembrana, com ativação levando a formação de segundos mensageiros, e ativação ou inibição da sinalização (Baik, 2013a). Existem 5 tipos diferentes de receptores de dopamina: D1, D2, D3, D4 e D5 (Baik, 2013a; Beaulieu, Gainetdinov, 2011). Existem as classes de receptores do tipo D1 e do tipo D2 (*D1- and D2-like classes*). A família do receptor do tipo D1 inclui os receptores D1 e D5, e a família dos receptores do tipo 2 inclui os subtipos D2, D3 e D4 (Cadet *et al.*, 2010). D1 e D2 são os receptores de dopamina mais abundantes no sistema nervoso central (Baik, 2013a; Jaber *et al.*, 1996). O receptor D2 tem de 10 a 100 vezes mais afinidade do que o D1 pela dopamina (Baik, 2013a). Os receptores D2 localizados na porção pré-sináptica, são chamados autorreceptores, eles atuam diminuindo a excitabilidade neuronal, inibindo a síntese de dopamina e reduzindo a sua liberação (Baik, 2013b).

A dopamina modula o comportamento alimentar, uma vez que baixos níveis da mesma podem interferir na motivação pela busca do alimento e na ingestão alimentar (Wang *et al.*, 2004). O estriado dorsal é relacionado à motivação ao alimento (Volkow *et al.*, 2002) enquanto o estriado ventral é relacionado à recompensa alimentar (Hernandez, Hoebel, 1988; Richardson,

Gratton, 1996; Bassareo, Di Chiara, 1999; Kelley, 2004). Embora o estriado dorsal seja mais envolvido com a motivação, Small e colaboradores (2003) demonstraram que o consumo de uma refeição prazerosa em seres humanos libera dopamina no estriado dorsal e a magnitude da liberação é relacionada ao grau de prazer experienciado pela refeição. A literatura mostra que a depleção de dopamina no estriado abole a motivação ao alimento. Camundongos com depleção deste neurotransmissor apresentam perda de motivação ao alimento tornaram-se hipofágicos, hipoativos e morrem de fome, o que pode ser restaurado com a reposição da mesma (Zhou, Palmiter, 1995). O bloqueio do receptor D2 e não o de D1 atenua o efeito hipofágico agudo da leptina em camundongos em jejum, e camundongos sem o receptor D2 (D2R KO) exibem resposta atenuada à leptina (Billes *et al.*, 2012). A maioria dos estudos com humanos indica a importância do receptor D2 na recompensa alimentar e sua associação com o desenvolvimento de obesidade (Baik, 2013a; Baik, 2013b).

Evidências sugerem que alterações na neurotransmissão dopaminérgica, disponibilidade receptores DA bem como a sua liberação, tem um papel importante na superalimentação e obesidade, em especial associados com a expressão de D2 no estriado (Stice *et al.*, 2010; Stice *et al.*, 2011; Salamone, Correa, 2013; Geiger *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2001). O ganho de peso está associado com reduzida resposta estriatal ao alimento palatável (Stice *et al.*, 2010). Indivíduos obesos apresentam uma redução do receptor D2 estriatal similarmente a adictos a drogas de abuso (Wang *et al.*, 2004). O IMC é correlacionado negativamente aos níveis do receptor D2: quanto maior o IMC, menores são os níveis de D2 (Wang *et al.*, 2001). A diminuição do receptor D2 estriatal tem sido relacionada a compulsão alimentar em animais obesos (Johnson, Kenny, 2010) e na diminuição da atividade metabólica no córtex orbitofrontal (OFC) e giro cingulado (ACC) em pessoas obesas (Volkow *et al.*, 2008). A disfunção no OFC e ACC resulta em compulsividade (revisado por Fineberg *et al.*, 2010), sendo sugerido que este possa ser o mecanismo pelo qual a baixa sinalização D2 estriatal facilita a hiperfagia (revisado por Volkow *et al.*, 2011).

A dieta indutora de obesidade reduz o metabolismo dopaminérgico no sistema mesolímbico independente do desenvolvimento de obesidade (Davis *et al.*, 2008). A diminuição da atividade dopaminérgica no VTA resulta em um drástico aumento no consumo de dieta hiperlipídica (Cordeira *et al.*, 2010). Camundongos expostos à dieta hiperlipídica com baixas concentrações de D2 no putâmen apresentam maior ganho de peso comparado com camundongos com altas densidades do receptor na mesma região (Huang *et al.*, 2006). Em estudos de imagem, foi visto que os indivíduos obesos apresentam diminuição da reatividade

no hipotálamo e nas áreas relacionadas à saciedade (Cornier *et al.*, 2009; Matsuda *et al.*, 1999). A dopamina liberada no hipotálamo é associada com a duração e números de refeições (Meguid *et al.*, 1995; Meguid *et al.*, 1997; revisado Meguid *et al.*, 2000).

Trabalhos sugerem a associação entre a obesidade e uma variante específica do polimorfismo Taq1A no gene do receptor D2 que afeta sua expressão (Ritchie, Noble, 2003; Fossella *et al.*, 2006). Existem três variantes dos alelos do polimorfismo Taq1A: A1/A1, A1/A2e A2/A2 (Baik, 2013b). Estudos *post-mortem* e Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET) sugerem que indivíduos com uma ou duas cópias do alelo A1 tem 30-40% menos receptores D2 comparado aos indivíduos sem o alelo A1 (Ritchie, Noble, 2003). Stice e colaboradores (2008a) através de ressonância magnética funcional (fMRI) mostraram que indivíduos com o A1 do polimorfismo *Taq1A* apresentam ativação estriatal mais fraca em resposta ao consumo alimentar e uma relação negativa entre a resposta estriatal e IMC, assim como futuro ganho de peso no seguimento de 1 ano, quando comparados aos indivíduos portadores de outros alelos (Stice *et al.*, 2008a, Stice *et al.*, 2008b; Stice *et al.*, 2011). Este autor também sugere que a menor resposta no estriado dorsal frente à recompensa alimentar em indivíduos obesos provavelmente é causada pela reduzida densidade de receptores D2 acarretando uma sinalização dopaminérgica comprometida, podendo levar a superalimentação para compensar o déficit na recompensa (Stice *et al.*, 2008a). Volkow e colaboradores (2011) sugerem que no obeso existe uma discrepância entre a recompensa esperada e a recebida, isso leva a compulsão alimentar como uma tentativa de atingir o nível da recompensa esperada.

A leptina e a insulina, sinalizadores do estado energético, modulam o sistema da recompensa (Fulton *et al.*, 2000; Fulton *et al.*, 2004; Figlewicz *et al.*, 2007). Receptores de insulina são expressos em várias regiões encefálicas entre elas o NAcc (Vogt, Bruning, 2013), neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo, incluindo o VTA e substância nigra (Figlewicz *et al.*, 2003). A injeção direta de leptina ou insulina dentro do VTA suprime/reduz a ingesta alimentar (revisado por Figlewicz *et al.*, 2007; revisado por Figlewicz, Benoit, 2009). Um estudo mostrou que a administração de leptina ou insulina intraventricular diminuiu a autoadministração de sacarose em ratos (Figlewicz *et al.*, 2006). A administração de leptina no VTA diminui o consumo de dieta padrão (Hommel *et al.*, 2006); Fulton e colaboradores (2006) mostraram que a leptina modula a sinalização de dopamina no NAcc. DAMGO, um agonista mu opioide, estimula a ingesta alimentar, a literatura mostra que a injeção de DAMGO no VTA estimula o consumo de *pellets* de sacarose e este foi revertido pela coadministração de leptina ou insulina (revisado por Figlewicz *et al.*, 2007; MacDonald *et al.*, 2004). A administração intraperitoneal de racloprida, antagonista do receptor D2, combinado à administração

intraventricular de insulina suprime agudamente o consumo de sacarose (Sipols *et al.*, 2000). A insulina exerce efeito direto no transportador de dopamina (DAT), pelo aumento da função do mesmo (e recaptção de dopamina) (Patterson *et al.*, 1998; Carvelli *et al.*, 2002; Mebel *et al.*, 2012). A administração de insulina no VTA reduz a ingesta de ração padrão (Bruijnzeel *et al.*, 2011), e diminui o consumo de dieta palatável (Mebel *et al.*, 2012). Mebel e colaboradores (2012) demonstraram que a insulina atua no VTA inibindo o comportamento alimentar, diminuindo a concentração de dopamina através do aumento da recaptção de dopamina pelo DAT. Baixos níveis de insulina circulantes, encontrados em modelos animais de diabetes e restrição alimentar, diminuem a expressão de DAT e conseqüentemente a recaptção de dopamina (Williams *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2006). Camundongos sem receptores de insulina no VTA e SN apresentam hiperfagia e desenvolvimento de obesidade (Konner *et al.*, 2011). No entanto, um estudo mostrou que a insulina pode amplificar a liberação de dopamina no núcleo accumbens e no caudado-putâmen através dos interneurônios colinérgicos estriatais que expressam receptores de insulina (Stouffer *et al.*, 2015).

Estudos apontam que a ação da insulina pode também estar ligada ao controle inibitório e a tomada de decisão, visto que níveis normais de insulina são necessários para a escolha de sabor num teste específico em animais (Stouffer *et al.*, 2015). A insulina central influencia na avaliação dos estímulos alimentares modulando as vias dopaminérgicas. Indivíduos resistentes à insulina apresentam redução no valor alimentar e alterações na ação central da insulina (Tiedemann *et al.*, 2017).

A alimentação hedônica tipicamente envolve o consumo de alimentos altamente palatáveis, e tem sido associada à via dopaminérgica mesolímbica, um regulador de comportamentos motivados e busca por recompensa (Cordeira *et al.*, 2010). O “querer” e o “gostar” são dois estados envolvidos no comportamento alimentar hedônico (revisado por Berridge, 2009). O “querer” é a motivação para algo, o impulso ou desejo de obter algo. O “gostar” é o componente hedônico do prazer. Às vezes, buscamos coisas sem necessariamente sentirmos prazer ao obtê-las (Lent, 2010). O sistema dopaminérgico estriatal é predominantemente implicado (embora não exclusivamente) no “querer”, os sistemas opioide e canabinoide são predominantemente (embora não exclusivamente) implicados no “gostar” (revisado por Volkow *et al.*, 2011).

Gugusheff e colaboradores (2015) adaptaram um esquema de ativação da via da recompensa de Nestler (2005), onde integra os sistemas opioide e dopaminérgico. Há o estímulo da recompensa através da droga ou alimento palatável que estimula neurônios do VTA, resultando na liberação de dopamina no NAcc. O estímulo recompensa pode ativar opioides

endógenos no VTA, que inibe interneurônios GABAérgicos. GABA normalmente inibe a liberação de dopamina. Esta inibição da liberação de GABA desinibe os neurônios dopaminérgicos, resultando no aumento da liberação de dopamina no NAcc. Os opioides também podem se ligar a seus receptores localizados no NAcc. A ativação desses neurônios alvo eferentes no NAcc cria um sentimento prazeroso associado com os estímulos de recompensa (figura 3).

Considerando tudo o que foi exposto, é possível que a modulação central da dopamina pela insulina seja alterada em indivíduos que nasceram com restrição de crescimento intrauterino, levando a uma resposta alterada da recompensa à alimentação, e a ingestão possivelmente aumentada de alimentos palatáveis, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade.

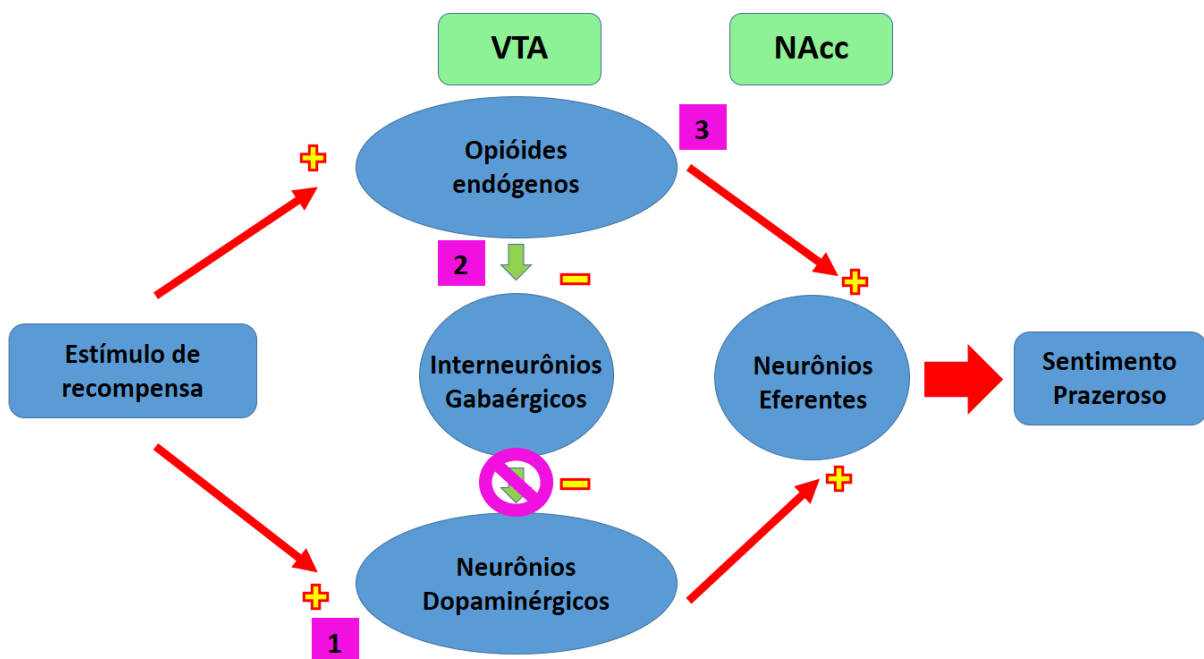


Figura 3: Adaptação de Gugusheff (2015) esquema de ativação da via da recompensa de Nestler (2005).

1.4 Restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e comportamento alimentar

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais têm mostrado que a RCIU programa mudanças no comportamento alimentar do indivíduo bem como é relacionada a alterações na preferência alimentar do mesmo (revisado por Dalle Molle *et. al.*, 2015b; Silveira *et al.*, 2012;

Ayres *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2007a; Dalle Molle *et al.*, 2015a; Alves *et al.*, 2015). Um dos primeiros estudos relacionando o baixo peso ao nascer à programação do comportamento alimentar foi um trabalho do nosso grupo de pesquisa. Foi realizada uma avaliação transversal de uma coorte longitudinal, prospectiva, de indivíduos nascidos no município de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, sudeste do Brasil), que investigou se a restrição de crescimento intrauterino (RCIU) estava associada com a preferência por macronutrientes específicos na prole, na qual as mulheres nascidas com RCIU severo ingeriram mais carboidratos aos 24 anos de idade do que as mulheres nascidas com peso normal. Esse achado persistiu após o ajuste para fatores de confusão, incluindo IMC atual e atividade física. Esse efeito foi acompanhado por uma diminuição na ingestão de proteína (Barbieri *et al.*, 2009).

Ayres e colaboradores (2012), também do nosso grupo de pesquisa, realizaram um estudo onde foi analisada a resposta hedônica a solução doce em bebês nascidos com 27 semanas de gestação. A resposta hedônica ao doce se correlacionou fortemente com o grau de RCIU ao nascer, quanto mais intensa a restrição menor foi a frequência da resposta hedônica observada. Foi proposto que RCIU está associada a menor sensibilidade ao sabor doce, com consequente aumento do consumo de alimentos palatáveis para obter o mesmo grau de prazer/recompensa.

Silveira e colaboradores (2012) avaliaram a impulsividade frente ao alimento palatável em crianças de 3 anos de idade. Foi visto que meninas nascidas com RCIU apresentaram maior impulsividade em resposta à presença de um doce disponível para o consumo. Essa resposta impulsiva (aos 3 anos de idade) foi inversamente relacionada a quantidade de gordura consumida e IMC (índice de massa corporal) aos 4 anos de idade. Nosso grupo de pesquisa em colaboração com outro laboratório realizou o projeto PROTAIA (Avaliação multidimensional e tratamento da ansiedade em crianças e adolescentes) que incluiu avaliação psiquiátrica e nutricional de adolescentes e adultos jovens. Neste projeto, vimos que indivíduos com RCIU optaram por um lanche com menor quantidade de proteína, gastaram menor valor em reais na compra do um lanche para consumo e apresentam uma menor conectividade em áreas relacionadas a recompensa (OFC, estriado dorsal/ventral, amígdala) (Dalle Molle, 2014). Como podemos observar os indivíduos restritos apresentam alteração da preferência alimentar ao nascer, aos 3 anos de idade, na adolescência e na vida adulta.

Em nosso laboratório temos estudado os efeitos da RCIU em roedores de acordo com o protocolo estabelecido por Desai e colaboradores (2005) no qual mães restritas recebem 50% da dieta das mães *Ad Libitum* (ver item 1.2 Restrição de Crescimento Intrauterino (RCIU)). Dalle Molle e colaboradores mostraram que animais restritos apresentam uma preferência

aumentada pelo alimento palatável comparado ao controle, no entanto exibem um menor condicionamento a este mesmo alimento no Teste de preferência condicionada por lugar (*Conditioned Place Preference* - CPP) (Dalle Molle *et. al.*, 2015a) e reduzidos níveis de D2 no NAcc. No estado basal, os machos RCIU apresentam níveis elevados de TH e fosfo-tirosina hidroxilase (pTH), mas após a exposição ao alimento doce os níveis de TH e pTH são maiores em fêmeas (Dalle Molle *et. al.*, 2015a). Esses dados sugerem que a RCIU modifica a sinalização dopaminérgica levando à alteração da preferência alimentar destes animais. Alves e colaboradores também encontraram que animais RCIU apresentam aumento da preferência pelo alimento palatável, aos 90 dias de vida machos restritos ingerem mais alimento doce do que os controles, fêmeas restritas precisaram de menos *trials* no Teste de flexibilidade cognitiva (*Attentional Set-Shifting Task* - ASST) (usando alimento doce como recompensa) (Alves *et.al.*, 2015). Esses achados sugerem que a subnutrição materna altera permanentemente a preferência alimentar da prole ao longo da vida.

Cunha e colaboradores (2014) avaliaram a atividade física em animais com RCIU. O grupo restrito apresentou menos atividade física espontânea comparado ao controle em machos, e em fêmeas restritas o efeito foi oposto; animais RCIU exibiram também maiores níveis de insulina e colesterol total. Esse estudo concorda com os achados encontrados em humanos (Kaseva *et. al.*, 2012) e animais (Vickers *et. al.*, 2003), mostrando que a RCIU afeta a atividade física espontânea e leva a resistência à insulina na vida adulta.

Logo, a RCIU está associada a uma maior preferência por alimentos hiperpalatáveis (revisado por Dalle Molle *et. al.*, 2015b; Silveira *et al.*, 2012; Ayres *et al.*, 2012) podendo contribuir para o acúmulo de adiposidade central e consequentes distúrbios metabólicos. Sugerimos nesta Tese que a RCIU altera a via da recompensa (ou via hedônica), modificando a resposta da via dopaminérgica e opioidérgica ao alimento doce, alterando a sinalização e interação entre esses sistemas. Uma das hipóteses é que a modulação central da dopamina pela insulina é alterada em indivíduos que nasceram com restrição de crescimento intrauterino, levando a uma resposta alterada da recompensa à alimentação, e a ingestão possivelmente aumentada de alimentos palatáveis, assim como contribuindo para o desenvolvimento da síndrome metabólica.

2 HIPÓTESE

Alterações na função da insulina no encéfalo de indivíduos expostos à restrição de crescimento intrauterino modificam a função da via da recompensa (sistemas opioide e dopaminérgico), gerando alterações no comportamento alimentar (figura 4).

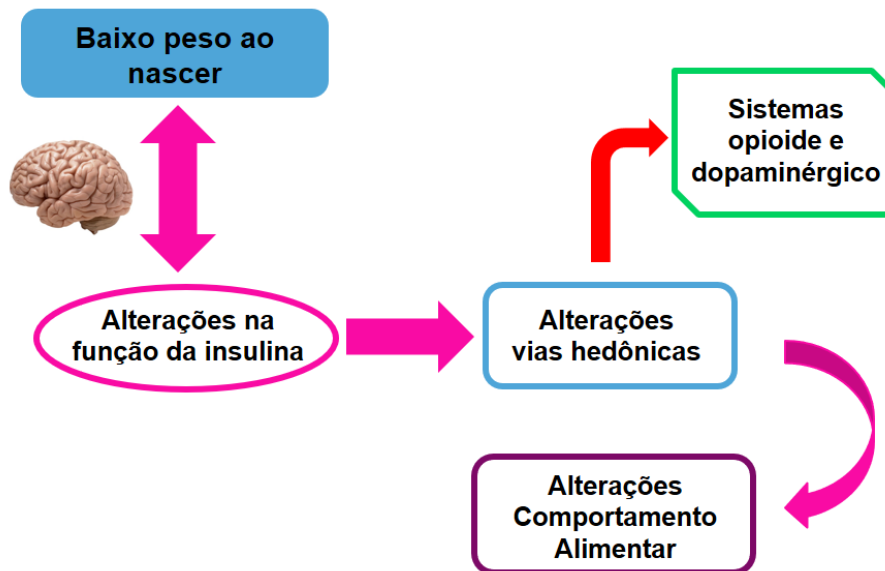


Figura 4: Hipótese da Tese.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral: Avaliar as possíveis alterações na resposta comportamental e neuroquímica frente ao alimento palatável em animais submetidos à RCIU.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Avaliar a resposta hedônica em animais submetidos a RCIU em diferentes idades utilizando o Teste de reatividade ao sabor (*Taste reactivity test*) – Artigo 1;
- b) Comparar os níveis de receptores mu opioides no núcleo accumbens entre animais submetidos a RCIU e controles em diferentes idades – Artigo 1;
- c) Comparar o consumo de alimento palatável e o nível de organização (entropia) do comportamento alimentar pela medida repetida de cada refeição ao longo de vários dias – Artigo 2;
- d) Comparar a liberação de dopamina no núcleo accumbens de animais submetidos a RCIU e controles em resposta ao consumo de ração padrão e de alimento palatável, e o efeito da injeção de insulina intraperitoneal sobre esta resposta neuroquímica – Artigo 2;
- e) Comparar os valores periféricos de insulina, assim como a cascata de sinalização da insulina no VTA através de avaliação de seus componentes entre animais RCIU e controles – Artigo 2;
- f) Comparar a fosforilação da tirosina hidroxilase (envolvidas na síntese de dopamina) no NAcc entre animais RCIU e controles – Artigo 2;

4 MÉTODOS E RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO I: Artigo - LAUREANO DP, DALLE MOLLE R, ALVES MB, LUFT C, DESAI M, ROSS MG, SILVEIRA PP. Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet taste in newborn pups - Role of the accumbal μ -opioid receptors. *Neuroscience*. 2016; 322:500-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.033.

INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION MODIFIES THE HEDONIC RESPONSE TO SWEET TASTE IN NEWBORN PUPS – ROLE OF THE ACCUMBAL μ -OPIOID RECEPTORS

D. P. LAUREANO,^{a*} R. DALLE MOLLE,^b M. B. ALVES,^a C. LUFT,^c M. DESAI,^d M. G. ROSS^d AND P. P. SILVEIRA^{a,b}

^a PPG Neurociências UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^b PPGSCA-HCPA-FAMED UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^c Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Dept of Ob/Gyn, Harbor-UCLA Med Ctr, Torrance, CA, United States

Abstract—Intrauterine growth restriction (IUGR) is associated with increased preference for palatable foods. The hedonic response to sweet taste, modulated by the nucleus accumbens μ -opioid-receptors, may be involved. We investigated hedonic responses and receptor levels in IUGR and Control animals. From pregnancy day 10, Sprague–Dawley dams received either an *ad libitum* (Control), or a 50% food restricted (FR) diet. At birth, pups were cross-fostered, and nursed by Adlib fed dams. The hedonic response was evaluated at 1 day after birth and at 90 days of life, by giving sucrose solution or water and analyzing the hedonic facial responses (within 60 s). Control pups exposed either to water or sucrose resolved their hedonic responses after 16 and 18 s, respectively, while FR hedonic responses to sucrose persisted over 20 s. FR pups had decreased phospho- μ -opioid-receptor ($p = 0.009$) and reduced phospho:total μ opioid receptor ratio compared to controls pups ($p = 0.003$). In adults, there was an interaction between group and solution at the end of the evaluation ($p = 0.044$): Control decreased the response after sucrose solution, FR did not change over time. There were no differences in phosphorylation of μ -opioid-receptor in adults. These results demonstrate IUGR newborn rats exhibit alterations in hedonic response accompanied by a decrease in μ -opioid-receptor phosphorylation, though these alterations do not persist at 3 months of age. Opioid system alterations in early life may contribute to the development of preference for highly palatable foods and contribute to rapid weight gain and obesity in IUGR offspring. © 2016 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: intrauterine growth restriction, hedonic response, μ -opioid receptor, palatable foods, opioid system.

INTRODUCTION

The Developmental Origins of Adult Disease concept proposes that environmental factors act early in life in order to program the risk of chronic diseases in adulthood (Hales and Barker, 1992). Epidemiological studies have provided evidence for the association between disturbances of the fetal nutritional environment (with consequent low birth weight) and increased prevalence of cardiovascular disease (Barker et al., 2002), hypertension (Barker et al., 1989) and type 2 diabetes (Eriksson et al., 2002), among many other adult chronic non-communicable diseases. Most of such conditions have increased adiposity as a common factor in their trajectory, and indeed being born small for a given gestational age (intrauterine growth restricted or IUGR) alters adult body composition (Ravelli et al., 1976, 1999; Bettiol et al., 2007; Pilgaard et al., 2011).

Simply put, obesity results in cases where the energy intake exceeds the expenditure. Therefore, the chronic consumption of calorie-enriched foods (high fat, high sugar, highly palatable) often precedes the development of overweight and its metabolic consequences (Sampey et al., 2011; Desai et al., 2014). Interestingly, human studies from our group and others show that IUGR is associated with a natural preference for palatable foods over the life course (Lussana et al., 2008; Barbieri et al., 2009; Stein et al., 2009; Perala et al., 2012; Crume et al., 2013; Migraine et al., 2013), and IUGR girls at 3 years of age are more impulsive when facing a sweet reward (Silveira et al., 2012). We also demonstrated that the hedonic response (taste reactivity) to a sweet solution delivered into the newborns' mouth in their first day of life varies according to their degree of IUGR (Ayres et al., 2012).

Taste reactivity to different solutions is an automatic behavior that demonstrates homology between humans and animals (Berridge, 2000; Steiner et al., 2001) and therefore shares underlying brain circuits. Hedonic feeding typically involves the consumption of highly palatable foods and has been behaviorally defined in two processes: "wanting" and "liking" (Berridge, 1996; Berridge and Robinson, 1998). "Wanting" is ultimately related to

*Corresponding author. Address: Departamento de Pediatria, FAMED, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-51-3359-8000; fax: +55-51-3359-8001. E-mail address: danielalaureano@hotmail.com (D. P. Laureano).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; FR, food restricted; GEE, generalized estimating equations; IUGR, intrauterine growth restriction; NAcc, nucleus accumbens; PFC, prefrontal cortex; VTA, ventral tegmental area.

the motivation to obtain the food reward, mostly dependent on mesolimbic dopamine circuits (Berridge et al., 2009). The “liking” component is the neural substrate of the elicited pleasure per se, and has the accumbal opioid system as its main neurobiological basis (Berridge, 2009).

Opioids are a family of peptides (β -endorphin, enkephalin, and dynorphins), each of which is cleaved from three prepropeptides (proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin, respectively), that differentially interact with three receptor classes (μ , δ , κ , in addition to the novel ORL 1 receptor) (Akil et al., 1984; Mollereau et al., 1994; Waldhoer et al., 2004). Studies show that opioid antagonists decrease, while agonists increase feeding in rats (Holtzman, 1974; Grandison and Guidotti, 1977; Glass et al., 1999). Sugar intake may lead to an increased number of and/or affinity for opioid receptors, which in turn leads to further ingestion of sugar and may contribute to obesity (Fullerton et al., 1985). The nucleus accumbens (NAcc) is an important site for opioid regulation of palatability (Pecina et al., 2006; Castro and Berridge, 2014). Opioid neurotransmission in this structure contributes to reward motivation (Pecina and Berridge, 2005) and is able to amplify the hedonic impact of sensory pleasure (Richardson et al., 2005).

Considering that IUGR influences the hedonic response to palatable flavors in newborn humans (Ayres et al., 2012; Rotstein et al., 2015), we aimed to (1) determine if similar findings are seen in a rodent model of IUGR; (2) investigate if these behavioral differences are stable over the life-course and (3) study the putative role of accumbal μ -opioid receptor in this behavior. Our hypothesis was that IUGR would affect the hedonic response to the sweet flavor in a persistent fashion over the life-course, and this would map onto levels of accumbal μ -opioid receptor phosphorylation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Primiparous Sprague–Dawley rats (CEMIB Laboratory Animal Reference Center, Campinas, SP, Brazil), at approximately 80 days old, were time-mated at our animal facility by vaginal smear visualization. During pregnancy they were single-housed in Plexiglas home cages (49 × 34 × 16 cm) and maintained in a controlled environment: altered dark/light cycle (lights on between 09:00 h and 19:00 h, due to maternal behavior observations in the dark phase of the cycle), temperature of 22 ± 2 °C, cage cleaning once a week, and food and water provided *ad libitum* (Adlib). At 10 days of gestation, dams were randomly allocated to two groups: control (Adlib; $n = 21$), receiving an *ad libitum* diet of standard laboratory chow (Nuvilab®) and 50% food restricted (FR; $n = 14$), receiving 50% of the *ad libitum* fed dam's intake (determined by quantification of normal intake in a cohort of pregnant Sprague–Dawley rats) (Desai et al., 2005). These diets were provided from day 10 of pregnancy to birth. Within 24 h after birth, pups were weighed and limited to eight per litter (four males and four females) and cross-fostered to other dams, forming the following groups

(examining the biological/adoptive mother, i.e., gestation/lactation maternal diet: Adlib_Adlib, FR_Adlib). The excess pups were used in the hedonic test at 1 day of life ($n = 90$ pups), and were immediately decapitated thereafter (see below). Eight pups/litter were left undisturbed until adulthood and a portion of them were submitted to hedonic test in adulthood ($n = 67$; 16–18 animals per group and sex). Remaining animals not used for the adult hedonic test were used in other projects. On postnatal day 21, pups were weaned, separated by sex, and allocated four to a cage. All animals were fed standard lab chow and water *ad libitum* and were kept in a controlled environment similar to that described above, except for the light cycle (lights on between 07:00 h and 19:00 h). From day 21 onward, at the time of cage cleaning once a week, body weight was measured using a digital scale with 0.01 g precision (Marte®, Canoas, Brazil).

All animal procedures were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, projects numbers 11-0053, 12-0353). Tasks were performed in climate-controlled behavioral rooms within our animal research facility (Unidade de Experimentação Animal/HCPA).

Taste reactivity test

Pups, at 1 day of life, were randomly divided and tested for hedonic response by receiving either a droplet (10 μ l) of distilled water or sucrose solution (0.3 M). After dripping the droplet on pup's mouth, using a 100- μ l micropipette, facial responses were filmed for 90 s. Films were watched frame by frame (30 frames/s) using the KMPlayer® software and scored by an observer blinded to the study allocation. According to Ganchrow et al. (1986), tongue protrusions (licking) and rhythmic mouth movements were the most salient features elicited by the sweet stimuli. Therefore the frequency of these positive facial responses (here called hedonic responses) (Berridge, 2000) were analyzed during the first 60 s, as proposed by Berridge (2000). After being filmed for 90 s, rat pups from the two test conditions (water or sucrose) were immediately decapitated, as brain responses are seen a few minutes after the intake of sucrose (Hajnal et al., 2009; McCutcheon et al., 2012).

In adults, at 90 days of life, the experiment occurred in the same way, except for the amount of solution delivered (200 μ L) and the sucrose solution concentration (1 M) (Berridge, 2000; Silveira et al., 2010). The test occurred over 2 days, whereby the same animal received both water (day 1) and sucrose (day 2). Similarly, the animals were decapitated immediately after the last test. Therefore, neurochemical findings in adulthood were observed only in the “sucrose condition”.

Hedonic taste reactivity response patterns were scored using time bin scoring procedures developed to assess hedonic vs. aversive taste valuations (Berridge and Grill, 1984; Berridge, 2000); this is an objective evaluation done by counting the number of frames in which tongue protrusions are exhibited by the animal after the sucrose stimulus. A time bin scoring procedure was used to ensure that taste reactivity components of different relative frequencies were balanced in their contributions

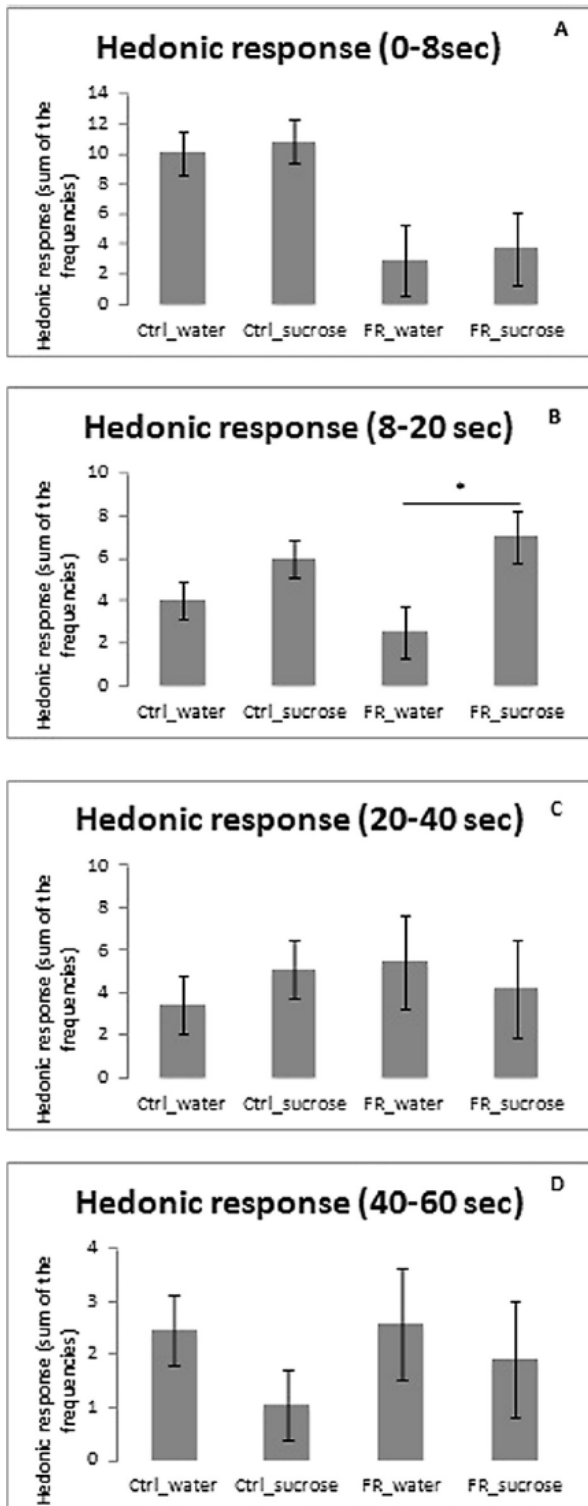


Fig. 1. Pups' taste reactivity test (sum of the hedonic response frequency). (A) 0–8 s; (B) 8–20 s; (C) 20–40 s; (D) 40–60 s. There was effect of the group only on the second period [$F(3,89) = 3.313$, $p = 0.024$]. DMS post hoc test shows that while Control rats do not differ when receiving water or sucrose, FR rats that received sucrose respond more than those that received water ($p = 0.011$).

to the final affective hedonic totals (Berridge, 2000). Hedonic responses included rhythmic midline tongue protrusions and lateral tongue protrusions. Individual totals were calculated for each rat by adding all response scores.

Neurochemical analysis

Both pups and adult animals had their brains quickly removed after decapitation, flash frozen in isopentane and stored at -80°C until analysis. After the brains were warmed up to -20°C and cut into thick sections of 0.1 cm with the aid of an Atlas (Paxinos and Watson, 2009) and macroscopically examined. The region of interest (nucleus accumbens) was identified and carefully isolated, and tissue was collected from 1-mm-diameter punches, which were processed for Western blot analysis as described below.

Tissue samples were homogenized in RIPA buffer (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, R0278), supplemented with protease (Complete, Roche) and phosphatase inhibitors (Phostop, Roche) and centrifuged to 13,000 RPM during 10 min at 4°C . Total protein was quantified using a BCA kit with bovine serum albumin as a standard (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Samples containing 30 μg of total protein were subjected to electrophoresis using a 4–12% polyacrylamide gradient gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), before being transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Wauwatosa, Wisconsin, USA). A gradient containing standard molecular weight markers (Magic Marker, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was run in parallel for molecular weight estimation. Blots were blocked in Tris buffer saline containing 5% non-fat milk concentrate and 1% Tween-20. The membranes were incubated overnight at $+4^{\circ}\text{C}$ with Anti-Phospho- μ Opioid Receptor (Ser375) Polyclonal Antibody (1:500) (Bioss antibodies, Woburn, MA, USA, cat: bs-3724R) this was followed by incubation with anti-rabbit antibody (1:2000) (Anti-Rabbit IgG, Cell Signalling, Danvers, MA, USA, cat: 7074 s) at room temperature for 1 h. The membrane was then exposed on a Kodak film using ECL (ECL western blotting analysis system, GE Healthcare, Wauwatosa, Wisconsin, USA, RNP 2106). The intensity of Western blot bands was quantified by densitometry analysis using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). After the membranes were stripped once with Glycine 7.5% (Nuclear, 311574) during 20 min and the Blots were blocked in Tris buffer saline containing 5% non-fat milk concentrate and 1% Tween-20. The membranes were incubated overnight at $+4^{\circ}\text{C}$ with Rabbit Anti- μ Opioid receptor Polyclonal Antibody (1:500) (Bioss antibodies, Woburn, MA, USA, cat: bs-3623R) this was followed by incubation with anti-rabbit antibody (1:2000) (Anti-Rabbit IgG, Cell Signalling, Danvers, MA, USA, cat: 7074 s), as shown above. Membranes that have been used in noncolorimetric immunodetection methods such as chemiluminescent techniques as we did here can be

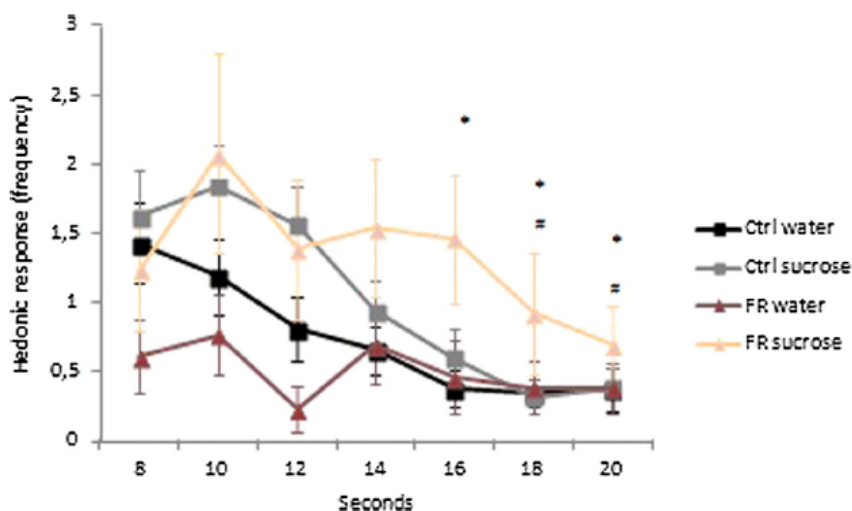


Fig. 2. Frequency of hedonic responses between 8 s and 20 s after expose to water or sucrose solution. Data expressed as mean \pm SEM. GEE demonstrates an interaction between group and time ($p = 0.027$). Post hoc Bonferroni; Control water: $^{\#}8$ vs. 16, $p = 0.002$; $^{\#}8$ vs. 18, $p = 0.002$; $^{\#}8$ vs. 20, $p = 0.048$; Control sucrose: $^{\#}8$ vs. 18, $p = 0.005$; $^{\#}8$ vs. 20, $p = 0.008$.

stripped of antibodies for use in subsequent rounds of Western blot detection. This allows the same blot to be probed for different proteins and saves sample material. Although PVDF membranes are recommended because they are more durable and resists loss of sample better, more recent studies also propose stripping on nitrocellulose membranes (Kar et al., 2015).

Results were calculated as a ratio of intensity of the protein of interest to that of Monoclonal Anti- α -Tubulin 1:2000 (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, T 6074) in the same membrane. The results were expressed as percentage of Controls.

Statistical analysis

All data were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test and tested for homogeneity of variances by Levene's test. The taste reactivity test was performed over 60 s, and this period was divided in four parts for statistical analysis (0–8 s, 8–20 s, 20–40 s, 40–60 s). The sum frequency of the hedonic responses was analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) (for pups, which were divided in four groups: Control water, Control_sucrose, FR_water, FR_sucrose) or repeated measures ANOVA (for adults, day 1 = water, day 2 = sucrose), followed by DMS post hoc test when appropriated. When differences were found, microanalysis of the period was performed by generalized estimating equations (GEE), which is appropriate to compare measures over time. The analysis was adjusted to birth weight, and a Poisson probability distribution with log link function and independent working correlation matrix structure was used, followed by Bonferroni multiple comparison test when appropriate.

The preliminary analysis considering sex as an independent variable yielded no statistical significant effect. Therefore males and females were analyzed together. The NAcc μ -opioid receptor levels were analyzed by a two-way ANOVA (group vs. solution in

pups) or Student's *T* test (only group in adults) followed by DMS post hoc test, when appropriate.

RESULTS

Birth weight

A two-way ANOVA adjusted for litter size showed that, at birth, FR pups weighed less than controls (FR = 5.26 ± 0.041 ; control = 6.65 ± 0.042) [$F(1,336) = 292.56$, $p < 0.001$], and females weighed less than males [$F(1,336) = 16.03$, $p < 0.001$], but no interaction between group and sex was observed [$F(1,336) = 2.29$, $p = 0.13$] (Alves et al., 2015). The induction of IUGR by food restricting the dams during pregnancy is well established in our laboratory and has been reproduced a number of times (Alves et al., 2015; Cunha Fda et al., 2015).

Taste reactivity test

In the pups, a one-way ANOVA of the four periods showed significant effects of the group only in the 8–20 s period [$F(3,89) = 3.313$, $p = 0.024$], but not the other periods (0–8 s, [$F(3,89) = 2.137$, $p = 0.102$]; 20–40 s, [$F(3,89) = 0.517$, $p = 0.672$], 40–60 s, [$F(3,89) = 1.264$, $p = 0.292$]). DMS pos hoc of the 8–20 s period shows that while Control rats do not differ when receiving water or sucrose, FR rats that received sucrose respond more than those receiving water ($p = 0.011$) (Fig. 1A–D).

A parallel analysis of the apparent group effect on the 0–8 s using a Two-Way ANOVA (group vs. solution) showed that there is an effect of the group [FR < Adlib, $F(1, 89) = 6.028$, $p = 0.016$], without other effects or interactions Fig. 1A.

Analyzing the facial responses by GEE in the first 20 s after exposure to water or sucrose solutions, we found an interaction between group and time [Wald = 31.23; $gl = 18$; $p = 0.027$; $n = 15$ –30/group] after the first 8 s until 20 s. The interaction evaluation using post hoc Bonferroni demonstrated that Control pups exposed to

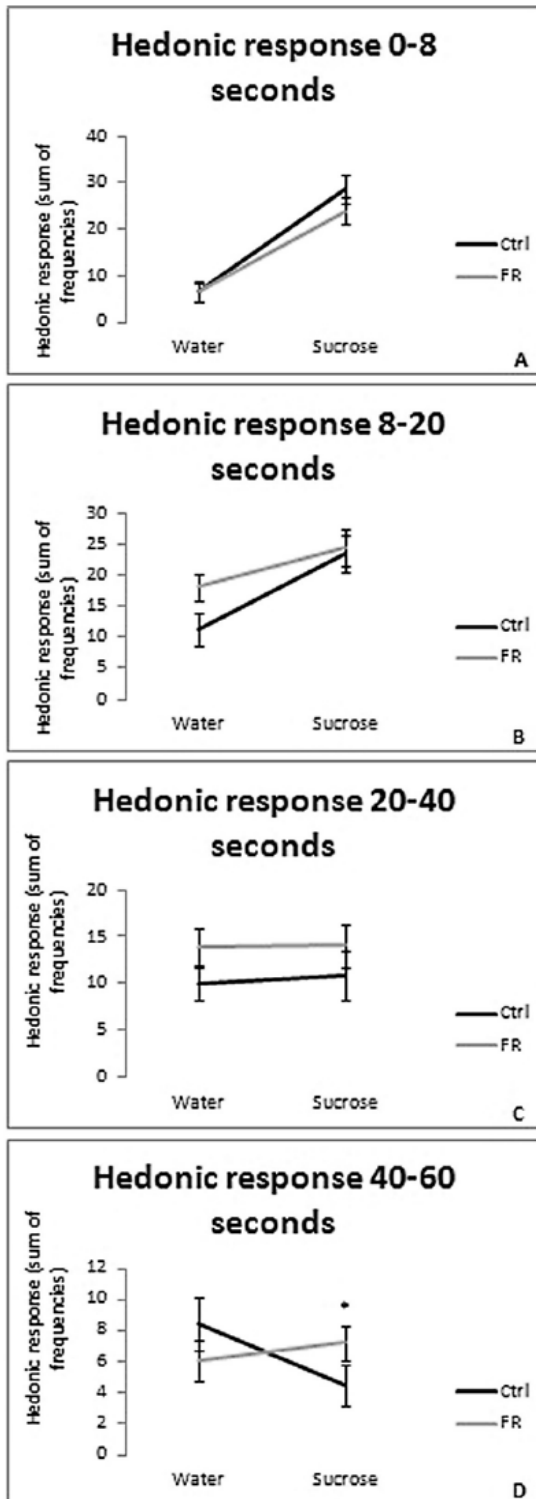


Fig. 3. Adults' taste reactivity test (sum of the hedonic response frequency). (A) 0–8 s; (B) 8–20 s; (C) 20–40 s; (D) 40–60 s. There was an interaction between group and solution on the fourth period [$F(1,30) = 4.424$, $p = 0.044$] in which Control rats decreased the response on the sucrose condition, while FR rats do not change.

water showed a reduction in hedonic responses after 16 s (Bonferroni 8 vs. 16, $p = 0.002$; 8 vs. 18, $p = 0.002$; 8 vs. 20, $p = 0.048$) and that Control pups exposed to sucrose

solution showed a reduction in hedonic responses after 18 s (Bonferroni 8 vs. 18, $p = 0.005$; 8 vs. 20, $p = 0.008$). In contrast, FR pups did not show this reduction over time (Bonferroni $p > 0.05$ for all comparisons) (Fig. 2).

In adults, a repeated measures ANOVA examining the frequency of the hedonic responses to water (day 1) and sucrose (day 2) conditions in the different periods showed an interaction between group and solution on the fourth period [$F(1,30) = 4.424$, $p = 0.044$], in which Control rats decrease the response in the sucrose solution, while FR rats do not change over time. There was an effect of the solution in the earlier periods as expected (0–8 s, [$F(1,30) = 76.634$, $p < 0.0001$]; 8–20 s, [$F(1,30) = 9.348$, $p = 0.005$]), but not on the latter periods (20–40 s, [$F(1,30) = 0.035$, $p = 0.853$] and 40–60, [$F(1,30) = 1.941$, $p = 0.174$]). There were no other interactions between group and solution (0–8 seconds, [$F(1,30) = 1.163$, $p = 0.289$]; 8–20 s, [$F(1,30) = 1.352$, $p = 0.254$], 40–60 s, [$F(1,30) = 0.065$, $p = 0.801$]). See Fig. 3.

Analyzing the facial responses in the last 20 s after exposure to water or sucrose solution, we found an interaction between group and time [Wald = 26.34; $gl = 9$; $p = 0.002$; $n = 33$ –34/group]. The interaction evaluation using post hoc Bonferroni demonstrated that FR rats exposed to water showed a reduction in hedonic responses between 46 and 48 s in comparison to FR rats exposed to sucrose (Bonferroni, $p = 0.02$) while there were no differences in Control rats (Fig. 4).

Phosphorylation of μ -opioid receptor in the NAcc

In pups, the μ -opioid levels were not different between the groups [$F(1,27) = 0.255$; $p = 0.618$] or solutions [$F(1,27) = 0.511$; $p = 0.482$], and no interactions were found [$F(1,27) = 1.778$; $p = 0.195$]. The phosphorylated (Ser375) portion was significantly decreased in FR pups [$F(1,27) = 8.170$; $p = 0.009$], independent of the solution [$F(1,27) = 0.009$; $p = 0.927$], without interaction between these variables [$F(1,27) = 0.102$; $p = 0.753$]. For the ratio, there was a main effect of the group, in which the FR group has decreased phospho- μ -opioid/ μ -opioid ratio (decreased phosphorylation) in comparison to Controls [$F(1,27) = 10.705$; $p = 0.003$], without effect of the solution [$F(1,27) = 0.095$; $p = 0.761$] and no interaction [$F(1,27) = 0.309$; $p = 0.584$] (Fig. 5A, B).

In adults, there were no differences between Control and FR rats in the μ -opioid levels [$t(26) = 0.352$, $p = 0.728$], phosphorylated portion [$t(26) = 0.823$, $p = 0.401$] or the ratio [$t(26) = 0.979$, $p = 0.337$] (Fig. 5C).

DISCUSSION

In this study we found that IUGR modifies the hedonic response to the sweet taste in newborn rat pups, a phenomenon that resembles that described by us in human newborns (Ayres et al., 2012) and other groups in humans (Rotstein et al., 2015) (see also (Laureano et al., 2015)) and rodents (Rubio-Navarro et al., 2014). In addition, this finding maps onto a different level of

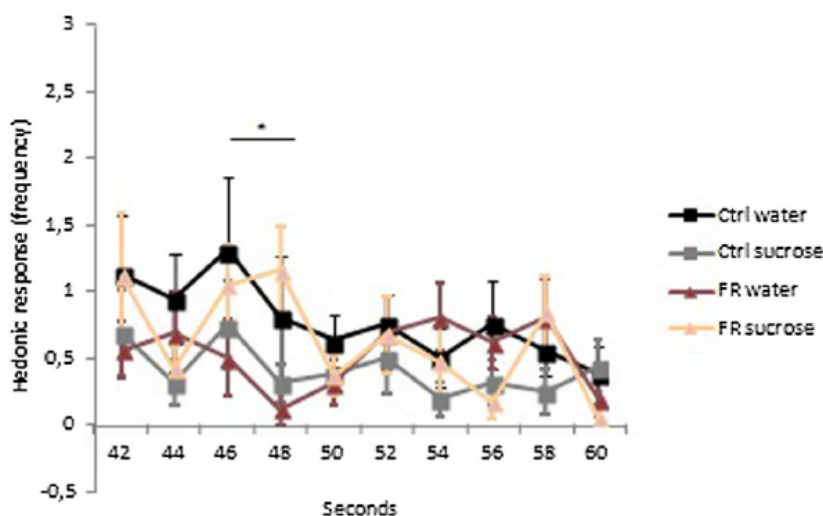


Fig. 4. Frequency of hedonic responses between 40 s and 60 s after expose to water or sucrose solution. Data expressed as mean \pm SEM. GEE demonstrates an interaction between group and time ($p = 0.002$). Post hoc Bonferroni; FR water vs FR sucrose, 46–48 s, $p = 0.02$.

phosphorylation of the μ -opioid receptor in the nucleus accumbens, which is established to play a role in the behavioral expression of hedonic response to sweet taste (Pecina et al., 2006). This finding confirms one of our hypotheses and suggests that IUGR programs the functioning of the accumbal opioid system early in life, influencing the acute behavioral response to a palatable sweet flavor. It is possible that this behavioral/neurochemical phenotype in newborns will influence the development of food preferences toward palatable foods in IUGR humans at varying ages (Barbieri et al., 2009; Silveira et al., 2012) (Lussana et al., 2008; Perala et al., 2012; Migraine et al., 2013). Recently, we described that IUGR rodent offspring exhibit altered food preferences (Dalle Molle et al., 2015) and the perception of the sweet flavor cues as adults (Alves et al., 2015).

The diminished response found in FR rats in the first few seconds after the beginning of the taste reactivity test, independent of the solution, could be due to a peculiar motor development associated with the growth restriction in this group (Zhang et al., 2010). Similar findings were described in (Rubio-Navarro et al., 2014), and these authors proposed that the findings could be explained by alterations in the synaptic connectivity and excitability of the circuit underlying gustatory movements associated with the food restriction during gestation (Salas et al., 2012).

It is of note that the behavioral differences between the groups in adulthood were very subtle, without differences in the neurochemical outcomes measured. While at first sight this could denote that the newborn findings have no relationship with altered food preferences in adult IUGR rats (Dalle Molle et al., 2015), it is important to highlight the role of the opioid system in the ontogeny of early feeding pathways and the establishment of feeding behaviors (Gugusheff et al., 2014). Studies demonstrate an early appearance of μ and κ -opioid receptor mRNA on the mesostriatal system by mid gestation in rodents, suggesting an early

expression of these receptors on dopaminergic terminal fibers (Georges et al., 1998), and the development of the dopaminergic mesocorticolimbic system extends up to 4 weeks of postnatal age (Gugusheff et al., 2015). Therefore, it is possible that the alterations found in the opioid system in IUGR newborns may set the stage for differential dopaminergic functioning in the mesocorticolimbic system, with consequent impact on food preferences. In other words, the lack of difference seen in opioid receptor protein levels in adult FR vs control offspring is due to early life changes in opioid receptor expression that led to downstream changes in dopamine signaling, thus changes in food preferences but not taste reactivity later in life.

Vucetic et al. (2010) demonstrated that maternal malnutrition through reducing protein diet content during pregnancy causes IUGR and an exaggerated response to cocaine in adulthood, hyperactivity when receiving a high-fat diet after weaning but decreased sucrose preference. While caloric and protein restriction during pregnancy are diverse models and apparently influence sucrose preferences differently, it is interesting to see that these authors observed that the IUGR offspring have increased expression of dopamine-related genes (TH and DAT) in brain regions related to reward processing (ventral tegmental area (VTA), NAcc, and prefrontal cortex (PFC)) and homeostatic control (hypothalamus), and increased content of TH and dopamine in the VTA and PFC, respectively. On the other hand, in our model, we find increased palatable/sweet food intake with decreased protein expression of TH and D2 on the PFC and NAcc (Alves et al., 2015; Dalle Molle et al., 2015), strongly suggesting that palatable food intake in adult models of IUGR map onto hypoactivation of the mesolimbic dopamine system.

There is evidence that early postnatal growth acceleration, which happened in our model (Cunha Fda et al., 2015), may exacerbate metabolic dysfunction during later life (Tamashiro and Moran, 2010) and modifies

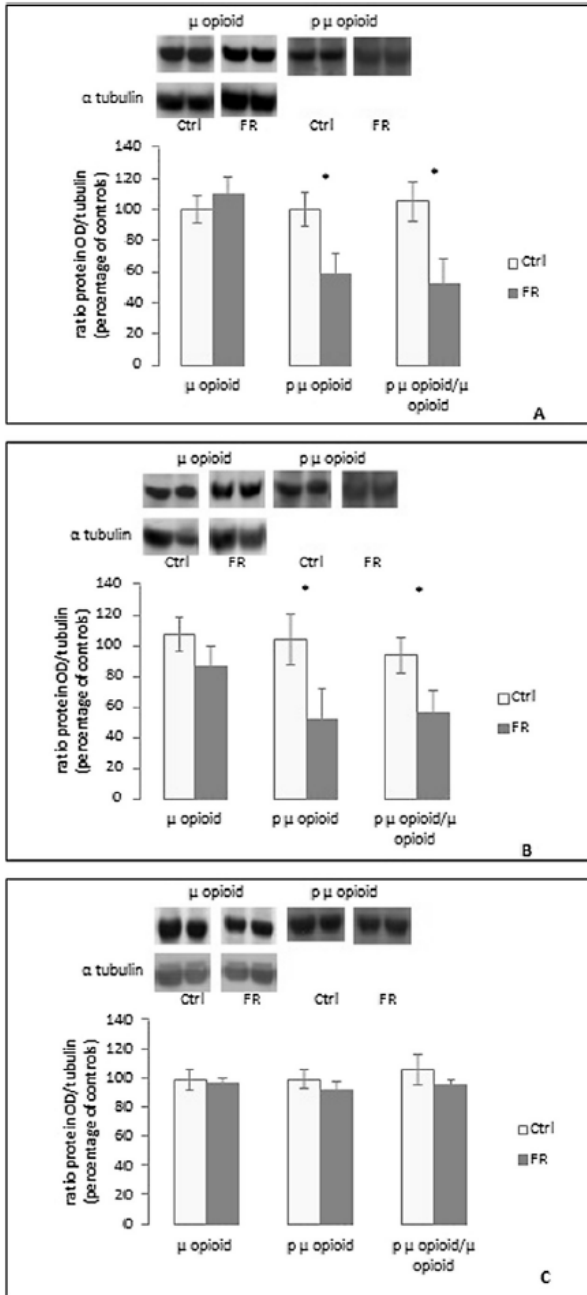


Fig. 5. Accumbal μ -opioid, phospho- μ -opioid and ratio (phospho- μ -opioid/ μ -opioid) in pups after receiving water (A) or sucrose (B) and in adults (C). There was a decreased phosphorylation in FR pups independent of the solution given ($p = 0.003$), and no differences in adults.

the expression of important receptors involved in the control of food intake and appetite such as leptin, 5-HT_{1A}, D1 and D2 in the hypothalamus (Manuel-Apolinar et al., 2014). Therefore, the differences observed between pups and adults in our study could be related to the accelerated growth in early life.

Opioids regulate the palatability or the hedonic evaluation of food (Berridge, 1996), (Calcagnetti and Reid, 1983). Opioids are heavily expressed throughout

the limbic system and linked to DA systems in many parts of the forebrain (Haber and Lu, 1995; Levine and Billington, 2004). μ -opioid receptor binding is significantly enhanced after three weeks on the intermittent sugar diet, compared to *ad libitum* chow. This effect was observed in the accumbens shell, cingulate, hippocampus and locus coeruleus (Colantuoni et al., 2001; Avena et al., 2008). Interestingly, the nucleus accumbens' anatomical heterogeneity leads to differential opioid function and responses according to the accumbal subregions under consideration. For instance, while the nucleus accumbens' rostradorsal quadrant responds to enhancements of sucrose "liking" for both μ , κ and δ stimulations, the response to the same stimulus within the caudal half of medial shell suppresses the "liking" reactions (Castro and Berridge, 2014). Although our dissections did not reach this level of preciseness, the association between decreased phosphorylated opioid receptor may indeed explain increased hedonic responses to sucrose.

Ong and Muhlhauser (2011) showed that exposure of dams to "junk food" can alter offsprings' food choices and the mesolimbic reward system functioning. At 6 weeks of life, μ -opioid receptor mRNA increased and DAT mRNA decreased in obese versus control group in their study. In addition, at 3 months of life, μ -opioid receptor mRNA decreased and DAT mRNA increased in the obese group. Considering their findings and ours, this is consistent with the idea that both undernutrition and overnutrition in early life can program the functioning of the reward system and consequently the risk for obesity (Grissom and Reyes, 2013). The periods of plasticity during the development of central reward systems begins before birth and extends into the fourth week of postnatal life in rodents (Gugusheff et al., 2015). As a large proportion of the maturation of brain circuits occurs after birth, this may explain why we see differences in the phosphorylation of the μ -opioid receptor only in the first day of life and not in adulthood.

The results of this study demonstrate that maternal undernutrition resulting in IUGR newborns results in altered NAcc opioid system expression and enhanced hedonic responses to sweet taste in early life. Although only subtle alterations persist to adulthood, we propose that the early hedonic responses to sucrose, and perhaps standard food, contribute to hyperphagia and rapid catch-up growth in IUGR offspring (Cunha Fda et al., 2015). In view of the association of rapid newborn weight gain with childhood and adult obesity, these sites of regulation may offer intervention opportunities for the prevention of metabolic syndrome.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they do not have conflicts of interest.

Acknowledgments—Financial support from: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA); Pró-Pesquisa/PROPESQ/UFGRS; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERENCES

- Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM (1984) Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7:223–255.
- Alves MB, Molle RD, Desai M, Ross MG, Silveira PP (2015) Increased palatable food intake and response to food cues in intrauterine growth-restricted rats are related to tyrosine hydroxylase content in the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Behav Brain Res*.
- Avena NM, Rada P, Hoebel BG (2008) Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev* 32:20–39.
- Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP (2012) Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr* 2012:657379.
- Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, Goldani MZ (2009) Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res* 65:215–220.
- Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ (1989) Weight in infancy and death from ischemic heart-disease. *Lancet* 2:577–580.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C (2002) Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31:1235–1239.
- Berridge KC (1996) Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20:1–25.
- Berridge KC (2000) Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev* 24:173–198.
- Berridge KC (2009) 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav* 97:537–550.
- Berridge KC, Grill HJ (1984) Isohedonic tastes support a two-dimensional hypothesis of palatability. *Appetite* 5:221–231.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309–369.
- Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW (2009) Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol* 9:65–73.
- Bettiol H, Sabbag D, Haeffner LSB, Barbieri MA, Silva AAM, Portella A, Silveira P, Goldani MZ (2007) Do intrauterine growth restriction and overweight at primary school age increase the risk of elevated body mass index in young adults? *Braz J Med Biol Res* 40:1237–1243.
- Calcagnetti DJ, Reid LD (1983) Morphine and acceptability of putative reinforcers. *Pharmacol Biochem Behav* 18:567–569.
- Castro DC, Berridge KC (2014) Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness "liking" and "wanting". *J Neurosci* 34:4239–4250.
- Colantuoni C, Schwenker J, McCarthy J, Rada P, Ladenheim B, Cadet JL, Schwartz GJ, Moran TH, Hoebel BG (2001) Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *NeuroReport* 12:3549–3552.
- Crume TL, Scherzinger A, Stamm E, McDuffie R, Bischoff KJ, Hamman RF, Dabelea D (2013) The long-term impact of intrauterine growth restriction in a diverse US cohort of children: the EPOCH study. *Obesity (Silver Spring)*.
- Cunha Fda S, Dalle Molle R, Portella AK, Benetti Cda S, Noschang C, Goldani MZ, Silveira PP (2015) Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the "similarities in the inequalities" model. *PLoS One* 10:e0118586.
- Dalle Molle R, Laureano DP, Alves MB, Reis TM, Desai M, Ross MG, Silveira PP (2015) Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats. *Brain Res* 1618:41–49.
- Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG (2005) Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R91–R96.
- Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG (2014) Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 211:237.e1–237.e13.
- Eriksson JG, Lindi V, Uusitupa M, Forsen TJ, Laakso M, Osmond C, Barker DJ (2002) The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on insulin sensitivity and insulin metabolism interact with size at birth. *Diabetes* 51:2321–2324.
- Fullerton DT, Getto CJ, Swift WJ, Carlson IH (1985) Sugar, opioids and binge eating. *Brain Res Bull* 14:673–680.
- Ganchrow JR, Steiner JE, Canetto S (1986) Behavioral displays to gustatory stimuli in newborn rat pups. *Dev Psychobiol* 19:163–174.
- Georges F, Normand E, Bloch B, Le Moine C (1998) Opioid receptor gene expression in the rat brain during ontogeny, with special reference to the mesostriatal system: an in situ hybridization study. *Brain Res Dev Brain Res* 109:187–199.
- Glass MJ, Billington CJ, Levine AS (1999) Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides* 33:360–368.
- Grandison L, Guidotti A (1977) Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. *Neuropharmacology* 16:533–536.
- Grissom NM, Reyes TM (2013) Gestational overgrowth and undergrowth affect neurodevelopment: similarities and differences from behavior to epigenetics. *Int J Dev Neurosci* 31:406–414.
- Gugusheff JR, Ong ZY, Muhlhauser BS (2014) Naloxone treatment alters gene expression in the mesolimbic reward system in 'junk food' exposed offspring in a sex-specific manner but does not affect food preferences in adulthood. *Physiol Behav* 133:14–21.
- Gugusheff JR, Ong ZY, Muhlhauser BS (2015) The early origins of food preferences: targeting the critical windows of development. *FASEB J* 29:365–373.
- Haber SN, Lu W (1995) Distribution of preproenkephalin messenger RNA in the basal ganglia and limbic-associated regions of the monkey telencephalon. *Neuroscience* 65:417–429.
- Hajnal A, Norgren R, Kovacs P (2009) Parabrachial coding of sapid sucrose: relevance to reward and obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1170:347–364.
- Hales CN, Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35:595–601.
- Holtzman SG (1974) Behavioral effects of separate and combined administration of naloxone and d-amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 189:51–60.
- Kar P, Agnihotri SK, Sharma A, Sachan R, Bhatt ML, Sachdev M (2015) A novel methodology for stripping and reprobing of western blots originally developed with colorimetric substrate TMB. *Methods Mol Biol* 1314:349–355.
- Laureano DP, Molle RD, Portella AK, Silveira PP (2015) Facial expressions in small for gestational age newborns. *J Child Neurol*.
- Levine AS, Billington CJ (2004) Opioids as agents of reward-related feeding: a consideration of the evidence. *Physiol Behav* 82:57–61.
- Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ (2008) Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* 88:1648–1652.
- Manuel-Apolinar L, Rocha L, Damasio L, Tesoro-Cruz E, Zarate A (2014) Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: implications of food intake. *Mol Med Rep* 9:407–412.
- McCutcheon JE, Beeler JA, Roitman MF (2012) Sucrose-predictive cues evoke greater phasic dopamine release than. *Synapse* 66:346–351.
- Migraine A, Nicklaus S, Parnet P, Lange C, Monnery-Patris S, Des Robert C, Darmaun D, Flamant C, Amarger V, Roze JC (2013)

- Effect of preterm birth and birth weight on eating behavior at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 97:1270–1277.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341:33–38.
- Ong ZY, Muhlhausler BS (2011) Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J* 25:2167–2179.
- Paxinos G, Watson C (2009) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam; Boston; London: Elsevier/Academic.
- Pecina S, Berridge KC (2005) Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci* 25:11777–11786.
- Pecina S, Smith KS, Berridge KC (2006) Hedonic hot spots in the brain. *Neuroscientist* 12:500–511.
- Perala MM, Mannisto S, Kaartinen NE, Kajantie E, Osmond C, Barker DJP, Valsta LM, Eriksson JG (2012) Body size at birth is associated with food and nutrient intake in adulthood. *PLoS One*:7.
- Pilgaard K, Mosbech TH, Grunnet L, Eiberg H, Van Hall G, Fallentin E, Larsen T, Larsen R, Poulsen P, Vaag A (2011) Differential nongenetic impact of birth weight versus third-trimester growth velocity on glucose metabolism and magnetic resonance imaging abdominal obesity in young healthy twins. *J Clin Endocr Metab* 96:2835–2843.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295:349–353.
- Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70:811–816.
- Richardson DK, Reynolds SM, Cooper SJ, Berridge KC (2005) Endogenous opioids are necessary for benzodiazepine palatability enhancement: naltrexone blocks diazepam-induced increase of sucrose-liking. *Pharmacol Biochem Behav* 81:657–663.
- Rotstein M, Stolar O, Uliel S, Mandel D, Mani A, Dollberg S, Reifen R, Steiner JE, Harel S, Leitner Y (2015) Facial expression in response to smell and taste stimuli in small and appropriate for gestational age newborns. *J Child Neurol*.
- Rubio-Navarro L, Torrero C, Regalado M, Salas M (2014) Analysis of the sensory and hedonic impacts of sweet and bitter tastes in perinatally underfed rats. *J Behav Brain Sci* 04:423–431.
- Salas M, Torrero C, Regalado M, Rubio L (2012) Development of the gusto facial reflex in perinatally undernourished rats. *J Behav Brain Sci* 02:308–314.
- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 19:1109–1117.
- Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA, Lucion AB, Dalmaz C (2010) Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci* 28:111–118.
- Silveira PP, Agranonik M, Faras H, Portella AK, Meaney MJ, Levitan RD, Maternal Adversity V (2012) Neurodevelopment study T. Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. *Pediatr Res* 71:293–298.
- Stein AD, Rundle A, Wada N, Goldbohm RA, Lumey LH (2009) Associations of gestational exposure to famine with energy balance and macronutrient density of the diet at age 58 years differ according to the reference population used. *J Nutr* 139:1555–1561.
- Steiner JE, Glaser D, Hawilo ME, Berridge KC (2001) Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev* 25:53–74.
- Tamashiro KL, Moran TH (2010) Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol Behav* 100:560–566.
- Vucetic Z, Totoki K, Schoch H, Whitaker KW, Hill-Smith T, Lucki I, Reyes TM (2010) Early life protein restriction alters dopamine circuitry. *Neuroscience* 168:359–370.
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73:953–990.
- Zhang Y, Li N, Yang J, Zhang T, Yang Z (2010) Effects of maternal food restriction on physical growth and neurobehavior in newborn Wistar rats. *Brain Res Bull* 83:1–8.

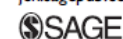
(Accepted 16 February 2016)
(Available online 27 February 2016)

4.2 CAPÍTULO II: Carta - LAUREANO DP, DALLE MOLLE R, PORTELLA AK, SILVEIRA PP. Facial Expressions in Small for Gestational Age Newborns. *Journal of Child Neurology* **JCR**, v. 31, p. 398-3. doi: 10.1177/0883073815592225.

Facial Expressions in Small for Gestational Age Newborns

Journal of Child Neurology
1-2

© The Author(s) 2015
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
jcn.sagepub.com



DOI: 10.1177/0883073815592225

In a recent article published in the *Journal of Child Neurology*, Rotstein et al suggest that there is no difference in the facial recognition patterns for taste between small for gestational age and control newborns, except for the perception of distilled water.¹ Nonetheless, when analyzing their Figure 1A, it seems to us that this result regarding water versus sucrose facial expressions resembles very much the one we described previously.² We evaluated 1-day-old preterm infants that received 24% sucrose solution or water on the taste reactivity test, and we found a highly positive correlation between fetal growth and the hedonic response in the group exposed to the sweet solution but not in the group exposed to water. In other words, the more intense the intrauterine growth restriction, the lower the frequency of the hedonic response observed, suggesting that intrauterine growth restriction is linked to a decreased sensitivity to the enjoyment elicited by the sweet taste.

However, because our results derived from a clinical trial, we were not able to compare the same child's response across different trials, as Rotstein et al could. Water is tasteless and odorless and therefore to us the pattern of response to water should be considered as a baseline or simple motor response. If Rotstein et al had studied the response using a sucrose to water ratio in each group, the expected pattern of reactivity in control children becomes clear, which almost double the hedonic response when tasting the sucrose solution in relation to water. On the other hand, the same ratio in small for gestational age children would be near to one, suggesting that they were unable to recognize the pleasurable sensation associated with sugar.

The authors interpreted the finding as if the control group had a decreased perception for water and attributed this odd finding to "an artifact due to multiple comparisons." To us, this is a simple misinterpretation of the data. The main question then becomes why is there such a discrete response to the other solutions tested (quinine, citrate). A possible explanation is that the "dislike" side of the scale has a worse discerning ability.³ Another question is why small for gestational age children have an increased baseline response to water when compared to controls; however, this is easily explained by a peculiar motor development in small for gestational age infants, which has been extensively described,^{4,5} and likely to be present already at birth.⁶

Besides using the response to distilled water as a baseline in the Rotstein et al study, it would have been interesting to see if there is a continuous correlation between birth weight and the response scale values; for that, they could have used the

birth weight ratio (observed birth weight divided by the mean population birth weight specific for sex and gestational age) as we did in our study.²

Rotstein and colleagues' findings reassure us about the idea that small for gestational age infants have indeed a difficulty in discriminating plain water from the sucrose flavor, as seen in our study.² We propose that this inability to detect the pleasurable sensation associated with sugar predisposes them to develop an increased consumption of palatable foods later in life, as we⁷⁻¹⁰ and others¹¹⁻¹⁴ have described. The increased preference for palatable foods could be an important factor contributing to the development of obesity and its metabolic consequences in the small for gestational age population.¹⁵ As intrauterine growth restriction is often seen in a context of social vulnerability and poor food security, the fetal programming of food preferences is an essential topic in preventive research.^{16,17}

D. P. Laureano, MSc

Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brazil

R. Dalle Molle, MSc, PhD

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brazil

A. K. Portella, MD, PhD

Department of Pediatrics, Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

P. P. Silveira, MD, PhD

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brazil

Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brazil

References

1. Rotstein M, Stolar O, Uliel S, et al. Facial expression in response to smell and taste stimuli in small and appropriate for gestational age newborns. *J Child Neurol*. 2015.

2. Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP. Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr*. 2012;2012:657379.
3. Rosenstein D, Oster H. Differential facial responses to four basic tastes in newborns. *Child Dev*. 1988;59:1555-1568.
4. Leitner Y, Fattal-Valevski A, Geva R, et al. Neurodevelopmental outcome of children with intrauterine growth retardation: a longitudinal, 10-year prospective study. *J Child Neurol*. 2007;22:580-587.
5. Fitzhardinge PM, Steven EM. The small-for-date infant. I. Later growth patterns. *Pediatrics*. 1972;49:671-681.
6. Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, et al. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res*. 2004;56:132-138.
7. Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, et al. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res*. 2009;65:215-220.
8. Silveira PP, Agranonik M, Faras H, et al. Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. *Pediatr Res*. 2012;71:293-298.
9. Escobar RS, O'Donnell KA, Colalillo S, et al. Better quality of mother-child interaction at 4 years of age decreases emotional overeating in IUGR girls. *Appetite*. 2014;81:337-342.
10. Portella AK, Kajantie E, Hovi P, et al. Effects of in utero conditions on adult feeding preferences. *J Dev Orig Health Dis*. 2012;3:140-152.
11. Migraine A, Nicklaus S, Parnet P, et al. Effect of preterm birth and birth weight on eating behavior at 2 y of age. *Am J Clin Nutr*. 2013;97:1270-1277.
12. Kaseva N, Wehkalampi K, Hemio K, et al. Diet and nutrient intake in young adults born preterm at very low birth weight. *J Pediatr*. 2013;163:43-48.
13. Perala MM, Mannisto S, Kaartinen NE, et al. Body size at birth is associated with food and nutrient intake in adulthood. *PLoS One*. 2012;7:e46139.
14. Crume TL, Scherzinger A, Stamm E, et al. The Long-term impact of intrauterine growth restriction in a diverse US cohort of children: the EPOCH study. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22:608-615.
15. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35:595-601.
16. Portella AK, Silveira PP. Neurobehavioral determinants of nutritional security in fetal growth-restricted individuals. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1331:15-33.
17. Portella AK, Silveira PP. Parenting: roots of the sweet tooth. *Science*. 2014;345:1571-1572.

4.3 CAPÍTULO III: Artigo - DP LAUREANO, MB ALVES, PM MIGUEL, TD MACHADO, AR REIS, AB MUCELLINI, FDAS CUNHA, C LAMPERT, APA SALVADOR, R DALLE MOLLE, PR MOSCA, I POKHVISNEVA, M DESAI, MG ROSS, PP SILVEIRA. Intrauterine growth restriction modifies the accumbal dopaminergic response to palatable food intake. A ser submetido.

Intrauterine growth restriction modifies the accumbal dopaminergic response to palatable food intake

DP LAUREANO¹, MB ALVES², PM MIGUEL¹, TD MACHADO³, AR REIS³, AB MUCCELLINI⁴, FDAS CUNHA³, C LAMPERT², APA SALVADOR⁵, R DALLE MOLLE³, PR MOSCA³, I POKHVISNEVA⁶, M DESAI⁷, MG ROSS⁷, PP SILVEIRA^{1,6,8}

¹ Programa de Pós Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ² Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ³ Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁴ Programa de Pós Graduação em Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁵ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁶ Ludmer Centre for Neuroinformatics and Mental Health, Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada; ⁷ Dept of Ob/Gyn, Harbor-UCLA Med Ctr, Torrance, CA, United States; ⁸ Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, McGill University, Sackler Program for Epigenetics & Psychobiology at McGill University, Montreal, QC, Canada.

Corresponding author: Patricia Pelufo Silveira

Douglas Hospital Research Centre, McGill University
6875 Boulevard LaSalle, Verdun, QC H4H 1R3

E-mail: patricia.silveira@mcgill.ca

Abstract

Background/Aims: Intrauterine growth restriction (IUGR) is defined when the fetus does not reach the expected size for the standard gestational age. It is related to increased preference for palatable foods and altered insulin sensitivity. Central dopamine modulation by insulin can lead to changes in response to reward. We aimed at evaluating the release of dopamine during palatable food intake in animals submitted to an IUGR protocol at baseline and in response to insulin. **Methods:** At gestation day 10, Sprague-Dawley dams were randomly assigned to receive *ad libitum* diet (AdLib) or 50% calorie restricted diet (FR). At birth, pups were cross-fostered generating two groups (pregnancy/lactation): AdLib/AdLib (Controls) and FR/AdLib (FR). In adulthood, palatable food consumption and feeding behavior entropy was assessed using the BioDAQ®, and the dopamine release facing standard chow and palatable food was measured by chronoamperometry recordings in nucleus accumbens (NAcc), with or without previous systemic insulin treatment (5UI/kg). **Results:** There is an interaction between group and time of the day on the palatable food consumption, in which FR rats eat more palatable foods than the Control group in the active period (dark), and the eating pattern has a higher entropy in FR group. There was a delayed dopamine release in the IUGR group in response to Froot Loops® (time to reach the peak DA release) ($p=0.047$), but not in response to standard chow ($p=0.806$). Insulin treatment reverted the difference observed when Froot Loops® were available ($p=0.05$). Western blot analysis showed that SOCS3 was decreased in the VTA of FR ($p=0.009$); pTH/TH was increased in the NAcc of FR as we have previously shown ($p=0.027$), but similarly to the chronoamperometry findings, this was reverted by insulin ($p=0.338$). **Conclusion:** It was observed a delay in the dopamine release and metabolic alterations in response to palatable foods in the FR group when compared to the Control group. The delay in dopamine release in FR individuals explains the increased intake of palatable foods and increased entropy in this group. These changes in the dopaminergic response to sweet food may lead to binge eating and obesity as well as its metabolic consequences in IUGR individuals.

Introduction

Exposure to fetal adversity is associated with altered impulsivity-based behaviors such as, increased preference for sugary foods at different ages in humans (Barbieri, Portella et al. 2009, Ayres, Agranonik et al. 2012, Portella, Kajantie et al. 2012, Silveira, Agranonik et al. 2012, Portella and Silveira 2014, Silveira 2014, Dalle Molle and Silveira 2015, Laureano, Molle et al. 2015, Reis RS 2016) and animals (Alves, Molle et al. 2015, Cunha Fda, Dalle Molle et al. 2015, Dalle Molle, Laureano et al. 2015, Laureano, Dalle Molle et al. 2016). This behavioral phenotype contributes to the development of prediabetes and type II diabetes – as well as its consequences such as cardiovascular and mental disease - over the life course in this population (Hales and Barker 1992, Eriksson, Wallander et al. 2004, Lahti, Eriksson et al. 2014, Li, Ley et al. 2015). We have described that altered behaviors towards a sweet reward can be seen already in the first day of life both in intrauterine growth restricted (IUGR) human newborns (Ayres, Agranonik et al. 2012) and rat pups (Laureano, Dalle Molle et al. 2016). This strongly suggesting that the fetal adversity exposure programs neurobiological pathways involved in reward sensitivity (Dalle Molle, Laureano et al. 2015, Laureano, Dalle Molle et al. 2016). These pathways are modulated by the action of insulin on its central receptors spread across different brain areas such as the ventral tegmentar area (VTA), the nucleus accumbens (NAcc) and the prefrontal cortex (PFC) (Sipols, Bayer et al. 2002, Figlewicz 2003). Interestingly, insulin secretion relative to insulin sensitivity is highly impaired in children and adults who grow poorly before birth (Jensen, Storgaard et al. 2002, Veening, van Weissenbruch et al. 2003, Mericq, Ong et al. 2005), occurring even before the onset of insulin resistance. Therefore, variations in insulin sensitivity in these brain areas may explain the behavioral characteristics from IUGR children/adults, and therefore be involved in shaping their phenotype towards a profile of the vulnerability to metabolic and psychiatric conditions later in life.

Insulin is known to act on the dopaminergic neurons of the ventral tegmental area (VTA), that project to the nucleus accumbens and PFC (Figlewicz, MacDonald Naleid et al. 2007), and modulate behavioral responses such as reward sensitivity and conditioning (Figlewicz, Bennett et al. 2008). This seems to be especially evident in situations of perinatal adversity (Portella, Silveira et al. 2015). Studies from other groups, based on the dietary maternal protein restriction during gestation, demonstrate alterations in brain systems involved in hedonic responses to sucrose. For example, increased levels of tyrosine-hydroxylase (TH) and dopamine in the VTA and PFC, respectively, and enhanced expression of genes responsible for TH and dopamine reuptake transporter (DAT) production in areas of the mesocorticolimbic

system (Vucetic, Totoki et al. 2010). Our group have already shown robust reduction in the expression of enzymes involved in dopamine synthesis in the NAcc and orbitofrontal cortex in adulthood in IUGR rats (Alves, Molle et al. 2015, Dalle Molle, Laureano et al. 2015). Therefore, in this work, we hypothesized that insulin differently modulates the behavioral and neurochemical DA response to palatable foods in adult rats exposed to IUGR compared to controls.

MATERIALS AND METHODS

Primiparous Sprague Dawley rats (CEMIB Laboratory Animal Reference Center, Campinas, SP, Brazil), at approximately 80 days old, were time-mated at our animal facility. During pregnancy, they were single-housed in Plexiglas home cages (49 x 34 x 16 cm) and maintained in a controlled environment: dark/light cycle (lights on between 7AM and 7PM), temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cage cleaning once a week, and food and water provided *ad libitum*. At 10 days of gestation, dams were randomly allocated to two groups: control (*AdLib*)(n=24), receiving an *ad libitum* (AdLib) diet of standard laboratory chow (Nuvilab®) and 50% food restricted (FR)(n=12), receiving 50% of the *ad libitum*-fed dam's intake (determined by daily quantification of normal intake in a cohort of pregnant Sprague Dawley rats) (Desai, Gayle et al. 2005). These diets were provided from day 10 of pregnancy until the day of birth of pups. Within 24 hours after birth, pups were weighed and limited to 8 per litter (4 males and 4 females) and cross-fostered to other AdLib dams, forming the following groups (considering the biological/adoptive mother, i.e., gestation/lactation maternal diet): AdLib/AdLib (control - CTRL) and FR/AdLib (FR). The excess pups and the females were used in a different study (projects HCPA/GPPG 12-0353, 13-0544, 14-0289 and 140111). On postnatal day 21, pups were weaned, separated by sex, and allocated four per cage. All animals were fed standard lab chow and water *ad libitum* and were kept in a controlled environment similar to the described above. From day 21 onwards, at the time of cage cleaning once a week, body weight was measured using a digital scale with 0.01 g precision (Marte®, Canoas, Brazil). The males (n=64 animals) were submitted to 2 experiments, a) evaluation of feeding behavior (n=16 animals) and insulin signaling in the mesocorticolimbic system (n=34 animals, Study 1) and b) evaluation of the accumbal dopamine response to palatable food by chronoamperometry (n= 14 animals, Study 2). No more than 2 animals per litter was used in each experiment.

All animal procedures were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, project numbers 13-0420, 13-0264, 14-0111, 13-0544, 11-0053, 14-0289, 120353. Tasks were performed in climate-controlled behavioral rooms within our animal research facility (Unidade de Experimentação Animal/HCPA).

Study 1: Evaluation of feeding behavior and insulin signaling in the mesocorticolimbic system

Feeding behavior analysis

At 80 days of life the rats were transferred into cages equipped with BioDAQ® food intake monitoring system (Research Diets). Rats were housed individually and provided access to the diets and water ad libitum. BioDAQ® consist in a computer system of feeding behavior analyses. Total food intake and meal pattern were analyzed with the BioDAQ® system as previously described (Farley, Cook et al. 2003, Machado, Dalle Molle et al. 2013, Dalle Molle, Laureano et al. 2015). Briefly, the system uses a food hopper mounted on an electronic strain gauge-based load cell to measure food intake. The food hopper is weighed 50 times per second (accurate to 0.01 g) and the mean and standard deviation (S.D.) of intake over approximately 1 sec are calculated by a peripheral computer. Feeding is signaled by a fluctuation in the food hopper weight (defined as a S.D. > 2000 mg) caused by the animal eating. Each feeding event (cage/animal number, start date and time, feeding duration, final hopper weight and amount eaten) was recorded and exported to a central computer, where it was entered into a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft, Redmond, WA) for the calculation and data summarization. There were two kinds of events recorded in BioDAQ®: bouts and meals. The end of a feeding bout was signaled when the hopper was left undisturbed for 5s (defined as a S.D.<2000 mg), at which point the duration of the feeding event and the amount eaten (initial hopper weight minus final hopper weight) was calculated. A meal was defined as a difference in hopper weight of >0.1g, separated from other feeding bouts within a range of 15 min (Surina-Baumgartner, Langhans et al. 1995, Eckel, Langhans et al. 1998). Rats remained in the apparatus for 8 days. The first 4 days were considered the habituation period, when rats were given access to standard rat chow in each Kg (2.95Kcal/g, 22% protein, 4,5% fat, 54% carbohydrate; NUVILAB®) and water ad libitum. The analysis focused on the last 4 days, during which the animals were

allowed to choose between standard rat chow (composition already described above and a highly palatable diet in each Kg (4.82 kcal/g, 8% mineral, 14% protein, 34% fat, 6% fiber, 30% carbohydrate, 20% of the latter derived from sucrose; Prag Soluções Biociências®). To avoid possible effects of neophobia, the animals received a small amount of the palatable diet inside their cages for two days before the beginning of the food choice experiment. The diets were replenished daily, simultaneously with the cleaning and maintenance of the BioDAQ® system (Kowalski, Farley et al. 2004).

Neurochemical analysis

At 100 days old, the animals were fasted for 4h and injected with insulin 1 IU/kg (ip.) or saline and decapitated after 15 min, or received no injection before decapitation (for insulin measurements). Brain tissue and blood were collected for analysis. Blood was collected in tubes and centrifuged at +4°C at 4000 rpm for 10min. Plasma was then separated in aliquots and frozen at -80°C until analysis. Plasma insulin levels were quantified at our laboratory by ELISA, using commercial reagents (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Millipore, EZRMI-13K). Brains were flash frozen in isopentane stored at -80 °C until analysis. The brains were then warmed to -20°C and cut into thick sections of 0.1 cm with the aid of an Atlas (Paxinos and Watson 2007). The bilateral punches were obtained in ventral tegmental area (VTA) and nucleus accumbens (NAcc) (Shahrokh, Zhang et al. 2010). The regions of interest were identified and carefully isolated, and tissue was collected from 1 mm diameter punches, which were processed for Western blot analysis as described below.

Tissue samples were homogenized in cytosol extraction buffer supplemented with protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma- Aldrich, P8340) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, 4906845001) and centrifuged to 6000 rpm during 2 min at +4 °C. Total protein was quantified using a BCA kit with bovine serum albumin as a standard (Pierce BCA Protein, Thermo Scientific, 23225). Aliquots of the supernatant containing 35 µg (VTA) or 25 µg of protein (NAcc) were incubated with LDS (Invitrogen, NP0007) and DTT (Sigma-Aldrich, 43815) at 99°C for 3 min. These samples were subjected to electrophoresis using a 4 to 12% polyacrylamide gradient gel (Invitrogen, NP0323BOX) together with a standard molecular weight (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo scientific, 26634), before being transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, RPN303C). Blots were blocked in Tris buffer saline containing 5%

non-fat milk concentrate and 1% Tween®20 (Sigma, P1379). We measured TH, pTH, in the NAcc, and SOCS3, AKT and pAKT in the VTA. The membranes were incubated overnight at +4°C with primary antibodies: TH 1:5000 (anti-tyrosine hydroxylase, Sigma-Aldrich, T2928), pTH 1:500 (anti-phospho tyrosine hydroxylase (Ser40), Invitrogen, 368600), SOCS3 1:500 (suppressor of cytokine signaling) (Cell Signaling, #2923), Akt (pan) (11E7) 1:1000 (Cell signaling, #4685), Phospho-Akt (Ser473) 1:1000 (Cell Signaling, #4060), followed by anti-mouse secondary antibodies (1:2500) (Anti-Mouse IgG, Cell Signaling, #7076s) or anti-rabbit (1:2500) (Anti-Rabbit IgG, Cell Signaling, #7074s) at room temperature for 1h. The membrane was then exposed on ImageQuant LAS 4000 GE Healthcare Life Sciences using ECL (ECL western blotting analysis system, GE healthcare, RNP2106). Results were calculated as a ratio of intensity of the protein of interest to that of actin 1:2000 (Sigma–Aldrich, A4700) in the same membrane. The results were expressed as percentage of controls (Colman, Laureano et al. 2015, Dalle Molle, Laureano et al. 2015, Laureano, Dalle Molle et al. 2016).

Study 2: Evaluation of the accumbal dopamine response to palatable food by chronoamperometry

Surgery

At 80 – 120 days of life, animals (n=14) were submitted to voltammetry analysis after stereotaxic surgery. They were anesthetized with ketamine 40mg/kg (ip.) and xylazine 5mg/kg (ip.), and maintained with isoflurane (in.) for induction 4-5% and maintenance 2-3% during surgery. Animals received tramadol 5 mg/kg (ip.) pre, and tramadol 2.5 mg/kg (ip.) post surgery, and sodium dipyrone 200 mg/kg (IM) during the surgical procedure for analgesia. Tramadol 5 mg/kg (ip.) was kept 12h/12 h and cetoprofen 5 mg/kg (ip.) 1x day for 2 consecutive days post operative. 40 µL of bupivacaine with epinephrine (0,2 mg per animal) was injected subcutaneously at the surgical site. Electrochemical probes were lowered into the NAcc shell (coordinates: 1.2 mm anterior to bregma, 0.8 mm lateral to the midline, and 7.0 mm ventral to the surface of the cortex) (Shahrokh, Zhang et al. 2010). Animals were also implanted with an Ag/AgCl reference electrode in the contralateral parietal cortex. Miniature pin connectors soldered to the voltammetric and reference electrodes were inserted into a connector (9-pin ABS Plug, Ginger Scientific, GS09PLG-220). The assembly was secured with acrylic dental

cement to four stainless steel screws threaded into the cranium (Paxinos and Watson 2007, Shahrokh, Zhang et al. 2010). Animals were returned to their home cages after a 2-5h recovery.

Electrochemical probes and measurements in freely moving rats

This experiment was performed according to (Shahrokh, Zhang et al. 2010). The voltammetric electrodes consisted of a bundle of three 30- μ m-diameter carbon fibers (Textron Systems, Wilmington, MA) extending 50–100 μ m beyond the sealed tip of a pulled glass capillary (outer diameter 0.5 mm), and repeatedly coated with a 5% solution of Nafion® (Sigma-Aldrich, 274704), a perfluorinated ionomer that promotes the exchange of cations such as dopamine but impedes the exchange of interfering anionic species such as ascorbic acid (AA) and 3,4 dihydroxyphenylacetic acid. Each electrode was calibrated to determine dopamine sensitivity and selectivity compared with AA in 0.1 M PBS (pH 7.4) that contained 250 μ M AA to mimic brain extracellular conditions. Electrodes used had a mean (\pm SEM) dopamine to AA selectivity ratio of 1619:1 \pm 133:1 (Doherty and Gratton 1997, Shahrokh, Zhang et al. 2010, McCutcheon, Beeler et al. 2012).

Dopamine was detected as current through its oxidation and reduction, and this was recorded using a computer controlled, high-speed chronoamperometric apparatus (Quanteon, Lexington, KY). An oxidation potential of +0.55mV (with respect to the reference electrode) was applied to the electrode for 100 ms at a rate of 2 Hz. The oxidation current was digitally integrated during the last 80 ms of each pulse. The sums of every 10 digitized oxidative cycles of the chronoamperometric waveform were automatically converted into equivalent values of dopamine concentration using the *in vitro* calibration factor. The reduction current generated when the potential was returned to resting level (0.0V for 100 ms) was digitized and summed in the same manner and served as an index to identify the main electroactive species contributing to the electrochemical signals. With Nafion-coated electrodes and a sampling rate of 2 Hz, the magnitude of the increase in reduction current elicited by an elevation in dopamine concentration is typically 60–80% of the corresponding increase in oxidation current [reduction to oxidation ratio (red:ox)], 0.6–0.8 (Doherty and Gratton 1997, Gerhardt, Ksir et al. 1999, Shahrokh, Zhang et al. 2010, McCutcheon, Beeler et al. 2012). **Supplementary information** is available at Youtube (<https://www.youtube.com/watch?v=Sf7L-34pqmc>).

In vivo electrochemical recordings

In the first postoperative day the animals received 6 pellets of Froot Loops® in the homecage to avoid food neophobia during the experiment. In the second postoperative day, we started the habituation to the voltammetry box. The animal was put in the apparatus (wooden box measuring 60 x 60 x 60 cm, with glass on the front door and a single hole at the top allowing the connection of the voltammetry cable), for 1 h, receiving 6 pellets of Froot Loops®.

Voltammetry recordings occurred from the third to the fifth postoperative day. On the first recording day, the animal remained in the apparatus for 2 hours for acclimatization and electrochemical signal stabilization, and then received 30 grams of standard rat chow (in small pieces) for 30 minutes on the voltammetry apparatus for recording the dopamine response to standard chow. After this period, chow was removed and the animal was allowed to remain quiet for 1 hour without receiving any food and again for signal stabilization. Thereafter, 15 pellets of Froot Loops® were offered for 30 min; food was removed after this period and the recordings were finalized after 1 hour to evaluate brain response to palatable food. On the second day of the experiment, after the 2 hours acclimatization, animals were injected with 100 microliters saline solution (ip.), offered 15 pellets Froot Loops® for 30 min; then the food was removed and the recordings were maintained for 1 h. The third day was similar to the second day, but instead of saline it was injected insulin 5 UI/kg (ip., added with saline solution until 100 microliters of total volume). The next day, the animal was killed by anesthetic overdose. The brains were removed and stored in 4% paraformaldehyde. Histology was performed to confirm the electrode position. Rats were kept under food restriction (receiving about 80% of habitual chow intake) during the recording days. From the 14 operated animals, data from 9 were kept after verifying electrochemical data and the electrode positioning.

Histological confirmation of electrode position

After voltammetry recordings, the electrode position in the recording site was validated by histology. Animals were deeply anesthetized with isoflurane and a +4.5 DC current was applied to the carbon fiber electrode in order to produce a lesion at the exact recording site in the brain (Ledo, Lourenco et al. 2015). Rats were then decapitated and the brains were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) solution in PBS for 24h, cryoprotected in 30% sucrose solution

until it sank to the bottom of the flask, and then frozen in isopentane and liquid nitrogen. Coronal sections (50 μm) of the brain were made using a cryostat (Leica, Wetzlar, Germany) with the aid of an Atlas (Paxinos and Watson 2007). The sections were mounted on gelatinized glass slides and stained with hematoxylin-eosin to verify the lesion site caused by the current applied to the microelectrodes. Rats with incorrect electrode position in the recording site ($n=5$) were excluded from the statistical analyses.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SEM, and were analyzed using Student's t-test (western blotting, plasma insulin); to analyze differences in birth weight we used two-way ANOVA (group vs. sex).

BioDAQ® data was analyzed in three different ways: a) Generalized Estimating Equations (GEE) with group, experiment days, time of the day (lit vs. dark cycle) as independent variables and total amount consumed as the outcome; consumption was adjusted by body weight and analyzed as grams consumed per 100g of weight; b) Using the continuous recording from BioDAQ®, we divided the 24 hours in 96 bins of 15 minutes and categorized the animal behavior into three possible states: resting/eating rat chow/eating palatable food. Unpredictability focuses on transitions from one type of state to another. We derived a measure of unpredictability by focusing on the conditional probabilities that describe transitions in behavior, as described in (Molet, Heins et al. 2016). Briefly, we characterized the rats' behavior using an empirical transition matrix of conditional probabilities of changing from one state to another. Entropy is a natural summary measure of randomness or unpredictability of a distribution, and can be defined in many measures. We focused on the Shannon entropy. We first calculated the probabilities to be in each of the three states for all rats together and used them as the stationary distribution of the Markov chain. The stationary probabilities serve as weights for the entropy values, which produce a measure known as the entropy rate (Molet, Heins et al. 2016), and these were compared between the groups using Student's t-test; c) Approximate entropy (ApEn) was calculated according to Richman (Richman and Moorman 2000): using the continuous measure as described in b), we calculated the tolerance, r , (0.3 times standard deviation of the consumption per 100g) for each subject. We defined that two sequences x_i and x_j will match if they are within a tolerance r , i.e. the distance between x_i and x_j is less than or equal r . Then for each subject we calculated two probabilities: that two

sequences of two consecutive periods will match and that two sequences of three consecutive periods will match. Further, for each subject we calculated approximate entropy, ApEn, as a negative logarithm of conditional probability that two sequences within a tolerance r for two consecutive periods will remain within tolerance r for the next period.

Voltammetry data was analyzed using GEE, having group and measure in the different exposures (rat chow, Froot Loops®, IP Saline_Froot Loops®, IP Insulin_Froot Loops®) as factors; Bonferroni posthoc was used to describe the differences. Three outcomes that summarize the DA response were chosen following the model as (Joyce, Glaser et al. 2007): Time of DA to reach the peak (“T rise”), amplitude of DA response (in mMol) and the time in which 80% of the DA has been cleared (T80, which provides information on DA reuptake).

Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R. Significance levels for all measures were set at $p=0.05$.

RESULTS

Birth weight

Two-Way ANOVA showed that, at birth, FR pups weighed less than controls [$F(1,382)=171.538$, $p<0.001$], and females weighed less than males [$F(1,382)=22.261$, $p<0.001$], but no interaction between group and sex was observed [$F(1,382)=0.424$, $p=0.515$], males (FR= 6.26 ± 0.12 ; control= 7.41 ± 0.07) and females (FR= 5.77 ± 0.09 ; control= 7.04 ± 0.08). At weaning, body weight difference between FR and controls was not observed anymore [$F(1,249)=0.665$, $p=0.416$], showing that FR groups had catch up in growth. Females weighed less than males [$F(1,249)=17.111$, $p<0.001$], and no interaction between group and sex was observed at 21 days [$F(1,249)=0.805$, $p=0.370$], males (FR= 56.99 ± 0.55 ; control= 56.93 ± 0.73) and females (FR= 53.66 ± 0.56 ; control= 54.79 ± 0.71). Sample size in this experiment reflects all animals adopted in the different projects listed in the Methods, as we decided not to trace exactly the pups that were designed for each project to avoid disturbing the litters in the critical first 21 days.

Study 1

Regular and palatable food consumption (BioDAQ®)

The analysis considering the average consumption of regular and palatable food over the last four days/nights of the experiment shows that the animals ate very little or nothing from the standard chow, and hence our focus was on the palatable food alone. An initial GEE analysis of the palatable food consumption revealed no effect of the experiment day (1 to 4) (Wald = 3.17; df = 3 p = 0.37) and no effect of the group (Wald = 1.12; df = 1 p = 0.27). However, there was an effect of the time of the day (lit vs. dark cycle) (Wald = 9.63; df = 1; p = 0.002). A follow up GEE analysis showed a significant interaction between group and time of the day (Wald = 10.43; df = 1; p = 0.001), in which FR animals eat more palatable food than control animals during the night (active) cycle (Figure 1A).

Differences in entropy rates, based on transition matrix from resting/eating rat chow/eating palatable foods were not significant when comparing the two groups over the 96 hours period (Student's t-test, t (14) =1.79, p=0.09). However, when breaking down between lit and dark cycle, FR group had significantly higher entropy during the dark cycle (t (14)= 2.72, p=0.02) but not during the lit cycle (t (14) =1.42, p=.18) (Fig 1 B, C, D).

Approximate entropy, a measure that also takes into account the variability in the amount consumed (ApEn), was also calculated to confirm the above results. FR group has increased ApEn during the dark cycle compared to Controls (FR=0.282±0.020, control=0.163±0.023, Student's t-test, t(14)=3.76, p=0.002), without differences during the lit cycle (FR=0.091±0.010, control=0.115±0.012, Student's t-test, t(14)=1.51, p=0.153).

Insulin levels in plasma

FR rats exhibit higher insulin levels than control (control, 1.086±0.224 ng/mL; FR, 2.034±0.322 ng/mL; Student's t-test, t(11)=2.472 p=0.031).

TH and TH phosphorylation in response to insulin in the NAcc

There were no statistically significant differences between groups in TH levels after saline [Student's t-test, $t(10)=0.198$, $p=0.847$] or insulin injection [Student's t-test, $t(10)=0.633$, $p=0.541$]. pTH levels were also similar between groups when exposed to saline [Student's t-test, $t(10)=0.952$, $p=0.364$] or insulin [Student's t-test, $t(10)=0.800$, $p=0.442$]. However, the ratio pTH/TH was increased in the FR group compared to controls when exposed to saline [Student's t-test, $t(10)=2.599$, $p=0.027$], which was completely reverted by insulin injection [Student's t-test, $t(10)=1.007$, $p=0.338$] (Table 1).

Insulin sensitivity and SOCS-3 in the VTA

AKT levels were similar between groups when exposed to saline [Student's t-test, $t(7)=1.022$, $p=0.341$] or insulin [Student's t-test, $t(9)=1.009$, $p=0.340$]. pAKT was not different between groups after saline [Student's t-test, $t(7)=0.916$, $p=0.390$] or insulin [Student's t-test, $t(9)=1.501$, $p=0.168$]. Similarly, the pAKT/AKT ratio was similar between groups after saline [Student's t-test, $t(7)=0.621$, $p=0.554$] and insulin injection [Student's T Test, $t(9)=0.280$, $p=0.786$]. SOCS-3 levels were diminished in FR compared to Controls after saline injection [Student's t-test, $t(7)=3.584$, $p=0.009$], but no differences were seen after insulin injection [Student's t-test, $t(9)=0.428$, $p=0.678$] (Table 2).

Study 2

In vivo electrochemical recordings

GEE was performed for the three main variables in the different food exposures as described in the Methods. Time of DA to reach the peak (T rise) was not different between the groups (Wald = 0.185; df = 1; $p = 0.667$), but there was an effect of the measure (Wald = 8.972; df = 3; $p = 0.030$), and a significant interaction between group and measure (Wald = 24.951; df = 3; $p < 0.001$). Posthoc analysis showed that FR and Control groups differ significantly after the exposure to Froot Loops® ($p = 0.006$), in which FR rats had a longer time to reach DA

peak. This is completely reverted when animals are injected with insulin before the test ($p = 0.006$), Figure 2A.

Amplitude was not different between groups (Wald = 1.134; $df = 1$; $p = 0.287$), but there was an effect of the measure (Wald = 8.215; $df = 3$; $p = 0.042$) and an interaction group*measure (Wald = 93.226; $df = 3$; $p < 0.001$). Bonferroni analysis showed that while there were no significant differences in amplitude in the different measures in the Control group, FR rats responded with higher amplitude levels when facing Froot Loops® only than in comparison to IP Saline_ Froot Loops® ($p=0.038$), Figure 2B.

T80 was not different between groups (Wald = 0.420; $df = 1$; $p = 0.517$), but there was an effect of the measure (Wald = 13.063; $df = 3$; $p = 0.005$) and an interaction group*measure (Wald = 45.415; $df = 3$; $p < 0.001$). However, posthoc analysis was not able to detect a significant interaction. The only detectable difference was on the general comparison between the response after rat chow and IP Insulin_ Froot Loops®, in which T80 was longer after insulin injection ($p = 0.024$). Visual inspection of the graph suggests that this is more evident on FR group, Figure 2 C.

DISCUSSION

In this study, we confirmed previous findings of increased palatable food intake in FR (IUGR) animals, in agreement to several previous studies from our group (Alves, Molle et al. 2015, Dalle Molle, Laureano et al. 2015, Laureano, Dalle Molle et al. 2016) and others (Vucetic, Totoki et al. 2010), and comparable to the findings in humans (Lussana, Painter et al. 2008, Barbieri, Portella et al. 2009, Migraine, Nicklaus et al. 2013). This seems to be associated with a more unpredictable and disorganized behavior in this group in the active phase of the dark cycle, as shown by the higher entropy rates. In addition, we showed that FR animals have increased peripheral insulin, in agreement to the “thrifty phenotype” hypothesis proposed by Hales and Barker in 1992 (Hales and Barker 1992), and this altered insulin sensitivity is seen at the level of the VTA through lower levels of SOCS-3 in these animals. FR rats are more sensitive to insulin action at a molecular level, showing normalization of the pTH/TH ratio after insulin injection. FR group also were shown to have longer time to reach dopamine peak when exposed to palatable food, but not rat chow, which was completely reverted by systemic insulin injection.

It is interesting that the well-known increased preference for palatable foods seen in IUGR rats is accompanied by higher behavioral unpredictability and higher approximate entropy, especially when considering that impulsivity seems to be a behavioral phenotype associated with the increased intake of palatable foods in these individuals, at least in humans (Ayres, Agranonik et al. 2012, Reis RS 2016). It has been suggested that behavioral patterns are altered through the shifting of entropy to different regions across the brain, or that unpredictable behavioral patterns are coupled with more predictable brain activation patterns (Smotherman, Selz et al. 1996, Hong, Barton et al. 2012). This seems to be especially evident in models of altered striatal dopamine function (Hong, Barton et al. 2012). Therefore, our behavioral findings showing increased palatable food and increased entropy rates in the FR group strongly suggested the involvement of altered DA function in response to this type of stimulus, which was confirmed by the electrochemical experiment.

We described a longer time to reach DA peak in response to sweet food – but not to regular chow – in FR animals. The increased intake of palatable foods seen in these animals could be an attempt to reach the same DA levels at the same temporal unit as control animals. Because activation of dopaminergic neurons facilitates the development of positive reinforcement during reward-seeking and behavioral flexibility (Adamantidis, Tsai et al. 2011), the longer time to reach DA peak in FR group is also in line with the poorer place conditioning to palatable food, despite higher intake, previously described by us in these animals (Dalle Molle, Laureano et al. 2015). Deficits in striatal dopaminergic transmission is also related to impulsivity in humans and in animals (Trifilieff and Martinez 2014), a feature that characterizes IUGR individuals as described above.

After saline injection, FR and controls have comparable time to reach DA peak, which may seem contradictory to the findings of longer T rise in response to Froot Loops® alone. However, the data suggests that the injection may have a differential effect on controls and FR animals, as the amplitude of DA response was different between Froot Loops® alone vs. saline injection only in the FR group. It is possible that differences in stress responsivity, largely described in IUGR (Li, Ramahi et al. 2013) explain these findings.

It is important to highlight that, after insulin administration (ip.), time to reach DA peak is much lower in the FR group when compared to controls. This suggests that, despite the special response to the IP injection, insulin was in fact able to completely revert the longer T rise in response to Froot Loops® in FR animals. Therefore, it seems that, the FR group is more sensitive to the insulin effects than the controls. This is confirmed by other findings such as the abolishment of NAcc pTH/TH differences seen in FR animals after IP insulin, and the longer

T80 in response to insulin apparently only in the FR group. Lower levels of VTA SOCS3 are in line with these findings.

Although IUGR is associated with insulin resistance, we could be seen a situation in young adult rats in which peripheral levels are already increased, facilitating signaling in some brain areas before exhaustion. Indeed, central insulin resistance appears to start in the hypothalamus (Sears and Perry 2015), and we have evidence that IUGR animals at this age have already increased hypothalamic SOCS-3 levels (Mucellini et al., in prep). Therefore, the behavioral outcome in IUGRs may be the result of the different patterns of insulin resistance in the diverse brain regions.

In sum, we describe here that fetal adversity is associated with altered brain sensitivity to insulin, which modulates the behavioral responses to cues such as palatable foods. As variations in dopamine function are associated with increased palatable foods in IUGR in humans as well (Silveira 2017), the current findings may have important implications in the development of chronic diseases later in life such as increased adiposity, metabolic syndrome, as well as associated conditions like cardiovascular conditions and mental disease. The discovery of the molecular mechanisms involved in the programming of behavioral features that put the individuals at risk for developing these conditions has important implications for preventive and therapeutic efforts.

LEGENDS TO FIGURES:

Figure 1: Palatable and regular food consumption evaluated in the BioDAQ® apparatus. Data is expressed as mean \pm SEM. A) Average palatable food consumption/100g body weight during the lit and dark phases of the light cycle. GEE analysis shows a significant interaction between group and time of the day, in which FR group eats more palatable food at night (*). B) Entropy rates considering the 96h and broken down into light cycle (C) and dark cycle (D). *There is higher entropy in the FR group during the dark cycle ($p < 0.05$).

Figure 2: *In vivo* electrochemical NAcc DA response to different conditions: exposure to rat chow and Froot loops at baseline and after IP saline or insulin. Data is expressed as mean \pm SEM. The three chosen variables summarize the DA response: A) T rise or time to reach DA peak after the stimulus. There was an interaction between group and measure in which FR rats have longer time to reach the peak after Froot loops at baseline, and this is completely reverted by insulin injection; B) Amplitude of the electrochemical response. There was an interaction between measure and group, in which FR rats respond differently to Froot Loops® when comparing baseline vs. saline injection; C) T80 or time for 80% DA clearance after the stimulus. Although there was a significant interaction between group and measure, posthoc shows only the general longer T80 after IP insulin when compared to responses to rat chow. These seem to be more evident in the FR group.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they do not have conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA); Pró-Pesquisa/PROPESQ/UFRGS; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERENCES

Adamantidis, A. R., H. C. Tsai, B. Boutrel, F. Zhang, G. D. Stuber, E. A. Budygin, C. Tourino, A. Bonci, K. Deisseroth and L. de Lecea (2011). "Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior." J Neurosci 31(30): 10829-10835.

Alves, M. B., R. D. Molle, M. Desai, M. G. Ross and P. P. Silveira (2015). "Increased Palatable Food Intake and Response to Food Cues in Intrauterine Growth-Restricted Rats Are Related to Tyrosine Hydroxylase Content in the Orbitofrontal Cortex and Nucleus Accumbens." Behav Brain Res.

Ayres, C., M. Agranonik, A. K. Portella, F. Fillion, C. C. Johnston and P. P. Silveira (2012). "Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants." Int J Pediatr 2012: 657379.

Barbieri, M. A., A. K. Portella, P. P. Silveira, H. Bettiol, M. Agranonik, A. A. Silva and M. Z. Goldani (2009). "Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women." Pediatr Res 65(2): 215-220.

Colman, J. B., D. P. Laureano, T. M. Reis, R. Krolow, C. Dalmaz, S. Benetti Cda and P. P. Silveira (2015). "Variations in the neonatal environment modulate adult behavioral and brain responses to palatable food withdrawal in adult female rats." Int J Dev Neurosci 40: 70-75.

Cunha Fda, S., R. Dalle Molle, A. K. Portella, S. Benetti Cda, C. Noschang, M. Z. Goldani and P. P. Silveira (2015). "Both Food Restriction and High-Fat Diet during Gestation Induce Low Birth Weight and Altered Physical Activity in Adult Rat Offspring: The "Similarities in the Inequalities" Model." PLoS One 10(3): e0118586.

Dalle Molle, R., D. P. Laureano, M. B. Alves, T. M. Reis, M. Desai, M. G. Ross and P. P. Silveira (2015). "Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats." Brain Res 1618: 41-49.

Dalle Molle, R. and P. P. Silveira (2015). "Small for gestational age children have specific food preferences." J Pediatr 166(6): 1547.

Desai, M., D. Gayle, J. Babu and M. G. Ross (2005). "Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288(1): R91-96.

Doherty, M. D. and A. Gratton (1997). "NMDA receptors in nucleus accumbens modulate stress-induced dopamine release in nucleus accumbens and ventral tegmental area." Synapse 26(3): 225-234.

Eckel, L. A., W. Langhans, A. Kahler, L. A. Campfield, F. J. Smith and N. Geary (1998). "Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in female rats." Am J Physiol 275(1 Pt 2): R186-193.

Eriksson, M., M. A. Wallander, I. Krakau, H. Wedel and K. Svardsudd (2004). "Birth weight and cardiovascular risk factors in a cohort followed until 80 years of age: the study of men born in 1913." J Intern Med 255(2): 236-246.

Farley, C., J. A. Cook, B. D. Spar, T. M. Austin and T. J. Kowalski (2003). "Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats." Obes Res 11(7): 845-851.

Figlewicz, D. P. (2003). "Insulin, food intake, and reward." Semin Clin Neuropsychiatry 8(2): 82-93.

Figlewicz, D. P., J. L. Bennett, S. Aliakbari, A. Zavosh and A. J. Sipols (2008). "Insulin acts at different CNS sites to decrease acute sucrose intake and sucrose self-administration in rats." American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology 295(2): R388-R394.

Figlewicz, D. P., A. MacDonald Naleid and A. J. Sipols (2007). "Modulation of food reward by adiposity signals." Physiol Behav 91(5): 473-478.

Gerhardt, G. A., C. Ksir, C. Pivik, S. D. Dickinson, J. Sabeti and N. R. Zahniser (1999). "Methodology for coupling local application of dopamine and other chemicals with rapid in vivo electrochemical recordings in freely-moving rats." J Neurosci Methods 87(1): 67-76.

Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." Diabetologia 35(7): 595-601.

Hong, S. L., S. J. Barton and G. V. Rebec (2012). "Neural correlates of unpredictability in behavioral patterns of wild-type and R6/2 mice." Commun Integr Biol 5(3): 259-261.

Jensen, C. B., H. Storgaard, F. Dela, J. J. Holst, S. Madsbad and A. A. Vaag (2002). "Early differential defects of insulin secretion and action in 19-year-old caucasian men who had low birth weight." Diabetes 51(4): 1271-1280.

Joyce, B. M., P. E. Glaser and G. A. Gerhardt (2007). "Adderall produces increased striatal dopamine release and a prolonged time course compared to amphetamine isomers." Psychopharmacology (Berl) 191(3): 669-677.

Kowalski, T. J., C. Farley, M. E. Cohen-Williams, G. Varty and B. D. Spar (2004). "Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism decreases feeding by reducing meal size." Eur J Pharmacol 497(1): 41-47.

Lahti, M., J. G. Eriksson, K. Heinonen, E. Kajantie, J. Lahti, K. Wahlbeck, S. Tuovinen, A. K. Pesonen, M. Mikkonen, C. Osmond, D. J. Barker and K. Raikkonen (2014). "Late preterm birth, post-term birth, and abnormal fetal growth as risk factors for severe mental disorders from early to late adulthood." Psychol Med: 1-15.

Laureano, D. P., R. Dalle Molle, M. B. Alves, C. Luft, M. Desai, M. G. Ross and P. P. Silveira (2016). "Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet taste in newborn pups - Role of the accumbal mu-opioid receptors." Neuroscience 322: 500-508.

Laureano, D. P., R. D. Molle, A. K. Portella and P. P. Silveira (2015). "Facial Expressions in Small for Gestational Age Newborns." J Child Neurol.

Ledo, A., C. F. Lourenco, M. Caetano, R. M. Barbosa and J. Laranjinha (2015). "Age-associated changes of nitric oxide concentration dynamics in the central nervous system of Fisher 344 rats." Cell Mol Neurobiol 35(1): 33-44.

Li, C., E. Ramahi, M. J. Nijland, J. Choi, D. A. Myers, P. W. Nathanielsz and T. J. McDonald (2013). "Up-regulation of the fetal baboon hypothalamo-pituitary-adrenal axis in intrauterine growth restriction: coincidence with hypothalamic glucocorticoid receptor insensitivity and leptin receptor down-regulation." Endocrinology 154(7): 2365-2373.

Li, Y., S. H. Ley, D. K. Tobias, S. E. Chiuve, T. J. VanderWeele, J. W. Rich-Edwards, G. C. Curhan, W. C. Willett, J. E. Manson, F. B. Hu and L. Qi (2015). "Birth weight and later life adherence to unhealthy lifestyles in predicting type 2 diabetes: prospective cohort study." BMJ 351: h3672.

Lussana, F., R. C. Painter, M. C. Ocke, H. R. Buller, P. M. Bossuyt and T. J. Roseboom (2008). "Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile." American Journal of Clinical Nutrition 88(6): 1648-1652.

Machado, T. D., R. Dalle Molle, D. P. Laureano, A. K. Portella, I. C. Werlang, S. Benetti Cda, C. Noschang and P. P. Silveira (2013). "Early life stress is associated with anxiety, increased

stress responsivity and preference for "comfort foods" in adult female rats." Stress 16(5): 549-556.

McCutcheon, J. E., J. A. Beeler and M. F. Roitman (2012). "Sucrose-predictive cues evoke greater phasic dopamine release than saccharin-predictive cues." Synapse 66(4): 346-351.

Mericq, V., K. K. Ong, R. Bazaes, V. Pena, A. Avila, T. Salazar, N. Soto, G. Iniguez and D. B. Dunger (2005). "Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children." Diabetologia 48(12): 2609-2614.

Migraine, A., S. Nicklaus, P. Parnet, C. Lange, S. Monnery-Patris, C. Des Robert, D. Darmaun, C. Flamant, V. Amarger and J. C. Roze (2013). "Effect of preterm birth and birth weight on eating behavior at 2 y of age." Am J Clin Nutr 97(6): 1270-1277.

Molet, J., K. Heins, X. Zhuo, Y. T. Mei, L. Regev, T. Z. Baram and H. Stern (2016). "Fragmentation and high entropy of neonatal experience predict adolescent emotional outcome." Transl Psychiatry 6: e702.

Paxinos, G. and C. Watson (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam, Elsevier.

Portella, A. K., E. Kajantie, P. Hovi, M. Desai, M. G. Ross, M. Z. Goldani, T. J. Roseboom and P. P. Silveira (2012). "Effects of in utero conditions on adult feeding preferences." Journal of Developmental Origins of Health and Disease 3(3): 140-152.

Portella, A. K. and P. P. Silveira (2014). "Neurobehavioral determinants of nutritional security in fetal growth-restricted individuals." Ann N Y Acad Sci.

Portella, A. K., P. P. Silveira, D. P. Laureano, S. Cardoso, V. Bittencourt, C. Noschang, I. Werlang, F. U. Fontella, C. Dalmaz and M. Z. Goldani (2015). "Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats." Behav Brain Res 278: 66-73.

Reis RS, D. M. R., Machado TD, Mucellini AB, Rodrigues DM, Bortoluzzi A, Bigonha SM, Toazza R, Salum GA, Minuzzi L, Buchweitz A, Franco AR, Pelúzio MCG, Manfro GG, Silveira PP. (2016). "Impulsivity-based thrifty eating phenotype and the protective role of n-3 PUFAs intake in adolescents." Translational Psychiatry.

Richman, J. S. and J. R. Moorman (2000). "Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy." Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(6): H2039-2049.

Sears, B. and M. Perry (2015). "The role of fatty acids in insulin resistance." Lipids Health Dis 14: 121.

Shahrokh, D. K., T. Y. Zhang, J. Diorio, A. Gratton and M. J. Meaney (2010). "Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat." Endocrinology 151(5): 2276-2286.

Silveira, P. P. (2014). "Playing with food: the fetal programming of food preferences." Obesity (Silver Spring) 22(5): 1210.

Silveira, P. P., M. Agranonik, H. Faras, A. K. Portella, M. J. Meaney, R. D. Levitan, V. Maternal Adversity and T. Neurodevelopment Study (2012). "Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype." Pediatr Res 71(3): 293-298.

Silveira, P. P., Pokhvisneva, I., Gaudreau, H., Atkinson, L., Fleming, A. S., Sokolowski, M. B., Steiner, M., Kennedy, J. L., Dubé, L., Levitan, R. D., Meaney, M. J. (2017). "Fetal growth interacts with multilocus genetic score reflecting dopamine signaling capacity to predict spontaneous sugar intake in children." Appetite.

Sipols, A. J., J. Bayer, R. Bennett and D. P. Figlewicz (2002). "Intraventricular insulin decreases kappa opioid-mediated sucrose intake in rats." Peptides 23(12): 2181-2187.

Smotherman, W. P., K. A. Selz and A. J. Mandell (1996). "Dynamical entropy is conserved during cocaine-induced changes in fetal rat motor patterns." Psychoneuroendocrinology 21(2): 173-187.

Surina-Baumgartner, D. M., W. Langhans and N. Geary (1995). "Hepatic portal insulin antibody infusion increases, but insulin does not alter, spontaneous meal size in rats." Am J Physiol 269(5 Pt 2): R978-982.

Trifilieff, P. and D. Martinez (2014). "Imaging addiction: D2 receptors and dopamine signaling in the striatum as biomarkers for impulsivity." Neuropharmacology 76 Pt B: 498-509.

Veening, M. A., M. M. van Weissenbruch, R. J. Heine and H. A. Delemarre-van de Waal (2003). "Beta-cell capacity and insulin sensitivity in prepubertal children born small for gestational age: influence of body size during childhood." Diabetes 52(7): 1756-1760.

Vucetic, Z., K. Totoki, H. Schoch, K. W. Whitaker, T. Hill-Smith, I. Lucki and T. M. Reyes (2010). "Early Life Protein Restriction Alters Dopamine Circuitry." *Neuroscience* 168(2): 359-370.

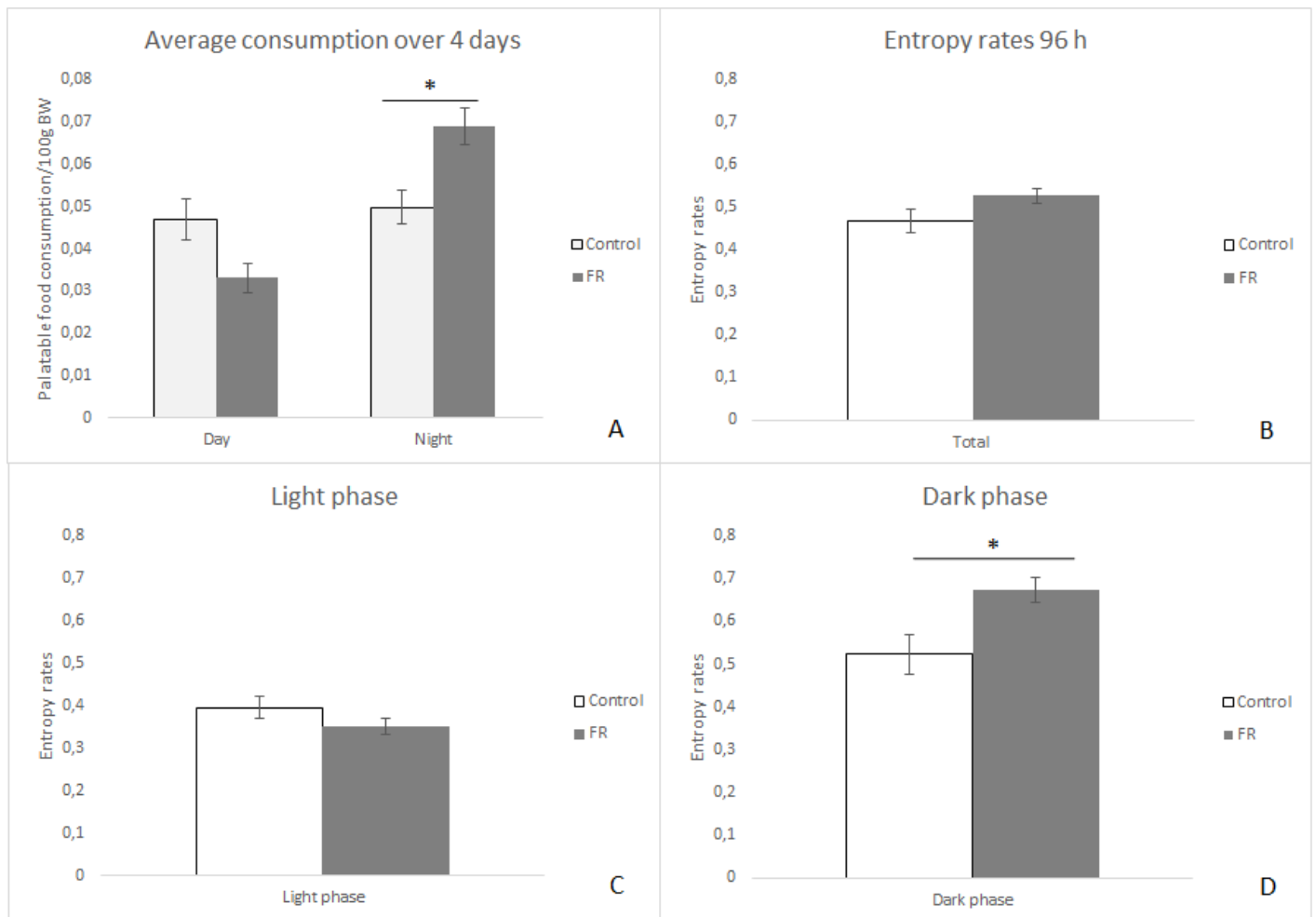


Figure 1

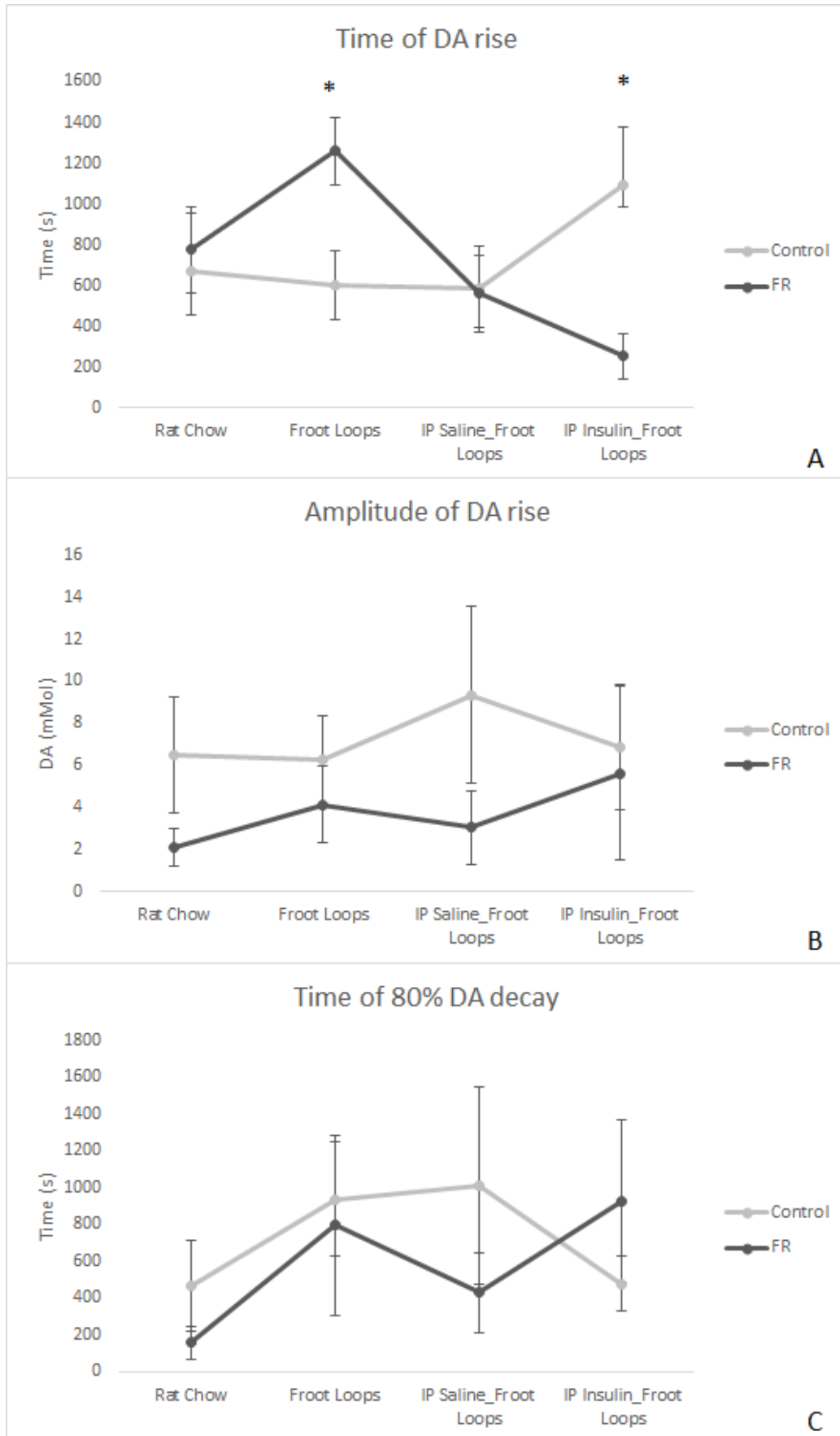


Figure 2

Table 1 – Ratio protein OD/Actin OD expressed as percentage of controls in NAcc

Protein	Controls		FR	
	Saline	Insulin	Saline	Insulin
TH	100 \pm 33.92	100 \pm 24.84	109.59 \pm 34.70	83.66 \pm 6.99
pTH	100 \pm 27.59	100 \pm 24.96	149.92 \pm 44.62	79.28 \pm 6.90
pTH/TH	1.11 \pm 0.10	1.07 \pm 0.10	1.40 \pm 0.06*	0.96 \pm 0.06

Student's t-test; data are expressed as mean \pm S.E.M.; * significant difference from Control Saline (p<0.05).

Table 2 – Ratio protein OD/Actin OD expressed as percentage of controls in VTA

Protein	Controls		FR	
	Saline	Insulin	Saline	Insulin
AKT	100 \pm 11.41	100 \pm 21.24	77.56 \pm 17.23	128.41 \pm 18.66
pAKT	100 \pm 11.25	100 \pm 17.62	80.77 \pm 16.33	136.97 \pm 17.02
pAKT/AKT	1.01 \pm 0.09	1.06 \pm 0.09	1.06 \pm 0.03	1.09 \pm 0.07
SOCS-3	100 \pm 7.42	100 \pm 22.99	46,72 \pm 11,78*	111.93 \pm 16.81

Student's t-test; data are expressed as mean \pm S.E.M.; * significant difference from Control Saline (p<0.05).

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O objetivo desse estudo foi avaliar as possíveis alterações na resposta ao alimento palatável em animais submetidos à restrição de crescimento intrauterino (RCIU) para isso estudamos as vias hedônicas opioide e dopaminérgica. Nossa hipótese foi de que a alteração na preferência alimentar em animais RCIU está associada a alterações no sistema dopaminérgico e opioide, possivelmente relacionados à uma modulação diferencial desses sistemas pela insulina, podendo levar à hiperfagia e ao desenvolvimento de obesidade, colaborando para o estabelecimento da síndrome metabólica.

A RCIU programa o indivíduo ao desenvolvimento da síndrome metabólica ao longo da vida. A escassez nutricional intrauterina afeta a formação das células pancreáticas alterando a homeostasia da glicose e da insulina fetal. A falta de substrato energético durante a formação fetal afeta o desenvolvimento do sistema nervoso central, alterando também a formação vascular e a elasticidade dos vasos sanguíneos, e causando diminuição do número de néfrons, podendo levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes na vida adulta Hales *et. al.*, 1991; revisado por Hales, Barker, 1992; revisado por Hales, Barker, 2001; Dahri *et. al.*, 1995; Snoeck *et. al.*, 1990).

No capítulo I foi avaliado como o RCIU modifica a resposta hedônica ao sabor doce com o artigo intitulado *Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet taste in newborn pups - Role of the accumbal μ -opioid receptors*. Neste artigo, avaliamos as expressões hedônicas ao sabor doce ou água destilada no primeiro dia de vida ou na vida adulta. Os resultados encontrados no primeiro dia de vida – alteração da resposta hedônica ao sabor doce - corroboram com outro publicado previamente no grupo de pesquisa, Ayres e colaboradores (2012), no qual foram descritas alterações nas expressões hedônicas de bebês nas primeiras horas de vida de acordo com o grau de RCIU ao qual haviam sido expostos; podemos afirmar que a RCIU altera a via hedônica tanto humanos quanto animais já no primeiro dia de vida.

A ativação de receptores μ opioides induz a inibição de neurônios GABAérgicos, resultando na desinibição de neurônios dopaminérgicos no VTA e facilitando a liberação de dopamina (Johnson, North, 1992; Cameron *et al.*, 1997; Ford *et al.*, 2006). Em pacientes com obesidade mórbida, a interação entre os sistemas dopaminérgico e opioide se dá de maneira alterada, podendo contribuir para modificações no processamento da recompensa nesses indivíduos (Tuominen *et al.*, 2015). No modelo de RCIU há uma desregulação da sinalização

opioide, sendo possível que os baixos níveis de insulina na vida intrauterina tenham modificado a formação do sistema opioide.

O capítulo II refere-se a carta *Facial Expressions in Small for Gestational Age Newborns* sobre uma análise do artigo de Rotstein e colaboradores (2015) intitulado *Facial Expression in Response to Smell and Taste Stimuli in Small and Appropriate for Gestational Age Newborns*. Nesse artigo, o autor não encontrou diferenças na resposta hedônica de bebês pequenos para idade gestacional entre os diferentes sabores, exceto quanto a percepção da água destilada – o que não fazia muito sentido para nós. Ao observar o trabalho original mais atentamente, percebemos que as diferenças na resposta à água são na verdade divergências na resposta basal. Ao interpretar os dados dessa forma, ajustando para a resposta à água, percebe-se que bebês nascidos pequenos na verdade respondem menos à solução doce, similarmente aos achados reportados por nós em Ayres e colaboradores (2012).

O capítulo III é o artigo a ser submetido intitulado *Intrauterine growth restriction modifies the accumbal dopaminergic response to palatable food intake*. Nesse estudo o objetivo foi avaliar a resposta hedônica frente ao alimento palatável em animais submetidos ao protocolo de RCIU avaliando o sistema dopaminérgico mesolímbico e sua modulação pela insulina. Os animais FR apresentaram preferência pelo alimento palatável acompanhado de um comportamento alimentar imprevisível e desorganizado, confirmado pelo aumento da entropia no ciclo escuro (ciclo ativo). Esses achados podem estar associados à alterada função do sistema dopaminérgico, como encontramos nos achados da cronoamperometria. Os animais FR tem um atraso para a dopamina alcançar o pico máximo após a ingestão de Froot Loops® comparado aos controles, o aumento da ingestão de alimentos palatáveis pode ser um mecanismo compensatório na tentativa desses animais atingirem os mesmos níveis de dopamina do que os controles. É interessante observar que o atraso para alcançar o pico máximo de dopamina (*T rise*) encontrado no grupo FR é revertido após a administração de insulina sistêmica. Efeito esse também foi encontrado no Western blotting, os níveis de pTH/TH foram normalizados após a injeção da mesma. Podemos sugerir que os animais FR tem uma aumentada sensibilidade à insulina nesta via, o que foi confirmado pelos menores níveis de SOCS3 encontrados no VTA. Enquanto a nível sistêmico a RCIU é relacionada com resistência à insulina como visto por nós pela hiperinsulinemia plasmática; em outro estudo do grupo de pesquisa foi encontrado o SOCS3 aumentado no hipotálamo (Mucellini *et al.*, in prep), um traço classicamente associado a resistência à insulina. Esses dados sugerem que as diferentes áreas encefálicas apresentam diferenciada sensibilidade à insulina, logo a resistência à insulina irá se estabelecer em diferentes momentos entre elas. De fato, o hipotálamo é geralmente a primeira região encefálica

a apresentar resistência à insulina no processo de desenvolvimento do diabetes tipo II, conforme sugerido por Sears e Perry (2015). Enquanto isso, no VTA, a RCIU está associada a maior sensibilidade à insulina, com modulação alterada da dopamina, associada a uma preferência aumentada pelo alimento palatável e um padrão alimentar desorganizado, possivelmente colaborando para o desenvolvimento de doenças metabólicas a longo prazo.

Visto que a RCIU programa o indivíduo ao desenvolvimento da síndrome metabólica ao longo da vida, é possível que os aumentados níveis de insulina plasmáticos circulantes observados em animais RCIU nesta tese, assim como maior sensibilidade à insulina no VTA geram uma supressão do sistema dopaminérgico pela inibição de neurônios dopaminérgicos no VTA e *downregulation* dos receptores de D2 no NAcc. A inibição dopaminérgica provoca aumento da ingestão de alimento palatável como uma resposta compensatória para obter o mesmo nível de recompensa, visto que a via está hipoativa, tais como acontece na obesidade (Volkow *et al.*, 2011). Esse maior consumo pode levar ao sobrepeso e o desenvolvimento de obesidade.

A exposição crônica a dieta hiperlipídica pode também tornar hiporresponsivo o sistema da recompensa (Davis *et al.*, 2008). Indivíduos obesos apresentam circuitos de recompensa hipo-funcionais, exibindo uma redução na resposta a alimentos palatáveis e necessidade de comer mais para compensar esse déficit (Stice *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2009). Neste estudo, os animais restritos apresentaram diminuição na resposta à recompensa, mas não apresentaram obesidade. Os animais não apresentaram compulsão alimentar para compensar a hipoativação do sistema de recompensa, no entanto apresentaram um aumento da preferência pelo alimento palatável e maior desorganização do padrão alimentar, o que pode significar um princípio de comportamento compulsivo. Provavelmente, o modelo de restrição, bem como a dieta hiperlipídica, podem afetar o sistema de recompensa e modificar epigeneticamente a expressão das proteínas e gerando resultados similares, apesar de serem modelos animais distintos. Um estudo mostrou que os efeitos nutrição materna baseada em alimentos pobre em nutrientes e ricos em calorias, “*junk food*” foi revertido pelo consumo de dieta com baixa proteína, em machos (Ong, Muhlhausler, 2014), sugerindo que a mudança da dieta pode amenizar os efeitos da programação fetal.

O hipotálamo lateral é o sítio chave de integração entre os circuitos homeostáticos e hedônicos, ele regula comportamentos de recompensa e auto estimulação (Figlewicz *et al.*, 2011). Populações neuronais do hipotálamo lateral estão envolvidas na regulação das vias homeostáticas e hedônicas do comportamento alimentar (revisado Leigh, Morris, 2016), neurônios dopaminérgicos no VTA recebe projeções do hipotálamo lateral influenciando na

modulação dopaminérgica (revisado por Stice *et. al.*, 2013). O modelo de RCIU afeta o controle alimentar homeostático como encontramos nos trabalhos de Desai e colaboradores (2007b e 2011a), a pobre nutrição fetal afeta o desenvolvimento do hipotálamo. Os altos níveis de insulina circulantes na periferia podem levar à resistência hipotalâmica. A sinalização alterada do hipotálamo resistente à insulina pode afetar a sinalização dopaminérgica via hipotálamo lateral. A sinalização hipotalâmica alterada enviada ao VTA, juntamente a um sistema dopaminérgico hiporresponsivo (*downregulation* de receptores D2), causado ambos pelos níveis aumentados de insulina, podem levar a um comportamento alimentar alterado. Como podemos observar as vias homeostáticas e hedônicas não são isoladas, logo a RCIU afeta ambas. Não foi o foco deste trabalho estudar a sinalização hipotalâmica, mas podemos deduzir que ela deve estar alterada nos animais aqui estudados.

Múltiplos fatores influenciam no controle do comportamento alimentar, tanto internos (vias homeostáticas e hedônicas, funções executivas, eixo *gut*-encéfalo) e externos (ambiente, dicas alimentares, hábitos sociais...) (revisado Berthoud *et al.*, 2017), influenciando na escolha do alimento. A RCIU é uma condição associada a maior risco para a síndrome metabólica na vida adulta (revisado por Desai, Ross, 2011b), modificações desde o nascimento contribuem para que o indivíduo afetado apresente um comportamento alimentar alterado, assim como mudanças estruturais, facilitando o desenvolvimento de obesidade. Podemos sugerir que as alterações metabólicas e estruturais causadas pela RCIU têm como principal sinalizador os níveis alterados de insulina ao longo do desenvolvimento. A insulina está envolvida desde a formação orgânica fetal e até a funcionalidade de diversos órgãos e sistemas ao longo da vida do indivíduo; modificando a sinalização das vias hedônicas, altera a preferência alimentar e colabora para o estabelecimento da síndrome metabólica. Mais estudos devem ser realizados de modo a identificar intervenções efetivas de modo a diminuir os efeitos da RCIU ao longo da vida. Estudos explorando os efeitos de intervenções como a prática de exercícios físicos e a adoção de uma dieta balanceada são necessários para esta população vulnerável, com a proposta prevenir ou retardar o estabelecimento da síndrome metabólica nesses indivíduos.

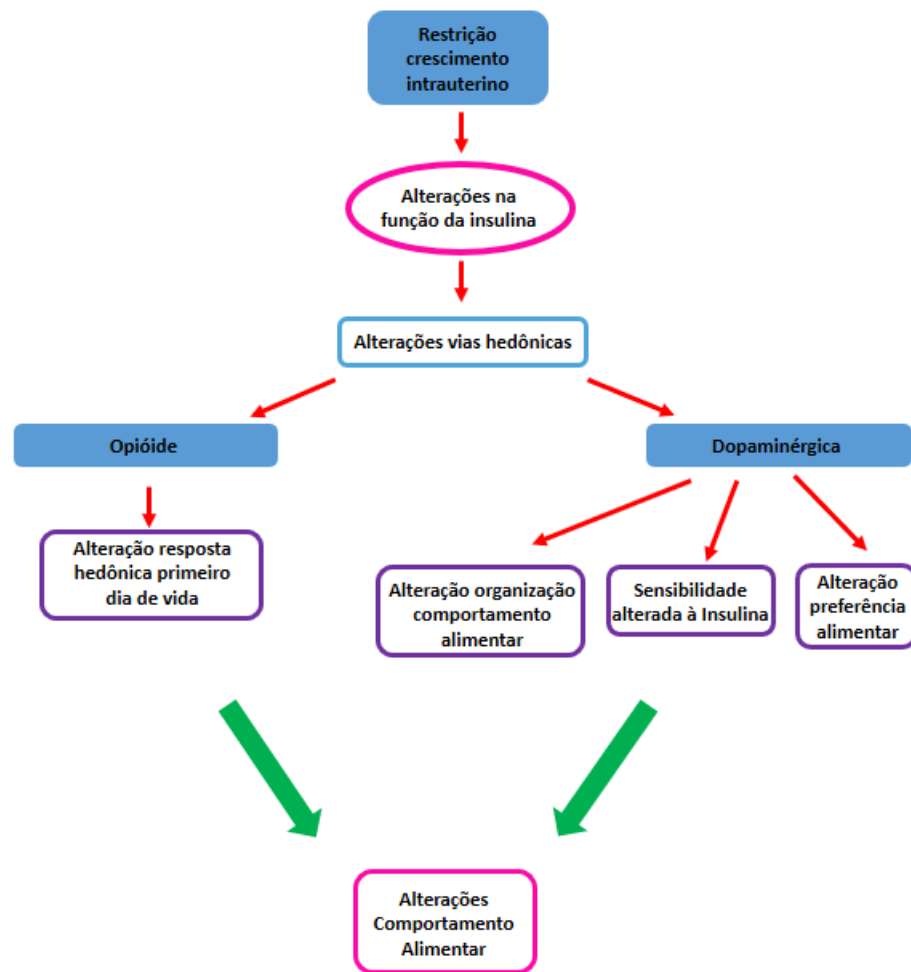


Figura 5: Resumo da teoria geral desta Tese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

Abel KM, Wicks S, Susser ES, Dalman C, Pedersen MG, Mortensen PB, Webb RT. Birth weight, schizophrenia, and adult mental disorder: is risk confined to the smallest babies? *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(9):923-30.

Abizaid A, Horvath TL. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept*. 2008; 149(1-3):3-10.

Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci*. 1984; 7:223–255.

Allan JL, Johnston M, Campbell N. Unintentional eating. What determines goal-incongruent chocolate consumption? *Appetite*. 2010; 54, 422–425.

Allan JL, Johnston M, Campbell N. Missed by an inch or a mile? Predicting the size of intention behaviour gap from measures of executive control. *Psychology & Health*. 2011; 26(6), 635e650.

Allan JL, McMinn D, Daly M. A bidirectional relationship between executive function and health behavior: Evidence, implications, and future directions. *Frontiers in Neuroscience*. 2016; 10:386.

Alves MB, Molle RD, Desai M, Ross MG, Silveira PP. Increased palatable food intake and response to food cues in intrauterine growth-restricted rats are related to tyrosine hydroxylase content in the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Behav Brain Res*. 2015; 287:73-81.

Apfelbaum M, Mandenoff A. Naltrexone suppresses hyperphagia induced in the rat by a highly palatable diet. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1981; 15: 89–91.

Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity-a review. *Neuropeptides*. 2006;40(6):375-401.

Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP. Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr*. 2012; 2012:657379.

Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest.* 1967; 46(10):1549-57.

Baik JH. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits.* 2013a; 7: 152.

Baik JH. Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB Rep.* 2013b; 46(11): 519–526.

Bailey RL. Influencing Eating Choices: Biological Food Cues in Advertising and Packaging Alter Trajectories of Decision Making and Behavior. *Health Commun.* 2017; 32(10):1183-1191.

Bakshi VP, Kelley AE. Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 265: 1253–1260.

Barbieri M, Portella A, Silveira P, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, Goldani MZ. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res.* 2009; 65:215-220.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989; 2:577-80.

Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 1993; 36:62–67.

Barker DJ. The fetal origins of type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 1999; 130(4 Pt 1):322-4.

Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol.* 2002; 31:1235-9.

Barker DJ, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med.* 2005; 353(17):1802–1809.

Barker, D.J. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2006; 49, 270–283.

Bassareo V, Di Chiara G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11, 4389–4397.

Bateson P, Martin P. *Design for a Life: How Behaviour Develops*. London: Jonathan Cape; 1999.

Bauer R, Walter B, Bauer K, Klupsch R, Patt S, Zwiener U. Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta Physiol Scand.* 2002;176(2):83-90.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):182-217.

Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestion behavior. *Neuroscience and Biobehavior Reviews.* 1996; 20(2):189-287.

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

Berthoud HR, Münzberg H, Morrison CD. Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology.* 2017;152(7):1728-1738.

Billes SK, Simonds SE, Cowley MA. Leptin reduces food intake via a dopamine D2 receptor-dependent mechanism. *Mol Metab.* 2012; 1(1-2):86-93.

Brower MC, Price BH. Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2001; 71:720–726.

Bruijnzeel AW, Corrie LW, Rogers JA, Yamada H. Effects of insulin and leptin in the ventral tegmental area and arcuate hypothalamic nucleus on food intake and brain reward function in female rats. *Behav. Brain Res.* 2011; 219, 254–264.

Cadet JL, Jayanthi S, McCoy MT, Beauvais, G.; Cai, N.S. Dopamine D1 Receptors, Regulation of Gene Expression in the Brain, and Neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010; 9(5): 526–538.

Cameron DL, Wessendorf MW, Williams JT. A subset of ventral tegmental area neurons is inhibited by dopamine, 5-hydroxytryptamine and opioids. *Neuroscience.* 1997; 77(1):155-66.

Campfield LA, Smith FJ. Blood glucose dynamics and control of meal initiation: a pattern detection and recognition theory. *Physiol Rev.* 2003; 83(1):25-58.

Capovilla AGS, Assef ECS, Cozza HFP. Avaliação neuropsicológica das funções executivas e relação com desatenção e hiperatividade. *Avaliação Psicológica.* 2007; 6(1), pp.51-60.

Carlsson A. A paradigm shift in brain research. *Science;* 2001, 294:1021–1024.

Carvelli L, Morón JA, Kahlig KM, Ferrer JV, Sen N, Lechleiter JD, Leeb-Lundberg LM, Merrill G, Lafer EM, Ballou LM, Shippenberg TS, Javitch JA, Lin RZ, Galli A. PI 3-kinase regulation of dopamine uptake. *J. Neurochem.* 2002; 81, 859–869.

Cavedini P, Gorini A, Bellodi L. Understanding obsessive-compulsive disorder: focus on decision making. *Neuropsychol. Rev.* 2006; 16:3–15.

Colzato LS, van den Wildenberg WP, van Wouwe NC, Pannebakker MM, Hommel B. Dopamine and inhibitory action control: evidence from spontaneous eye blink rates. *Exp Brain Res.* 2009;196(3):467-74.

Cooper SJ. Naloxone: effects on food and water consumption in the non-deprived and deprived rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1980;71(1):1-6.

Cooper, S.J. Effects of opiate agonists and antagonists on fluid intake and saccharin choice in the rat. *Neuropharmacology.* 1983; 22, 323e328.

Cordeira JW, Frank L, Sena-Esteves M, Pothos EN, Rios M. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. *J Neurosci.* 2010; 30(7): 2533-41.

Cornier MA, Salzberg AK, Endly DC, Bessesen DH, Rojas DC, Tregellas JR. The effects of overfeeding on the neuronal response to visual food cues in thin and reduced-obese individuals. *PLoS One.* 2009; 4: e6310.

Cunha FdaS, Dalle Molle R, Portella AK, Benetti Cda S, Noschang C, Goldani MZ, Silveira PP. Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the "Similarities in the Inequalities" model. *PLoS One.* 2015; 4;10(3):e0118586.

Daban C, Martinez-Aran A, Torrent C, Tabares-Seisdedos R, Balanza-Martinez V, Salazar-Fraile J, Selva-Vera G, Vieta E. Specificity of cognitive deficits in bipolar disorder versus schizophrenia. A systematic review. *Psychother. Psychosom.* 2006; 75:72–84.

Dahri S, Reusens B, Remacle C, Hoet JJ. Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin-dependent diabetes. *Proc Nutr Soc.* 1995; 54(2):345-56.

Dalle Molle, R. Mecanismos envolvidos na programação fetal do comportamento alimentar pela restrição de crescimento intrauterino em roedores e humanos. 2014. 112 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Dalle Molle R, Laureano DP, Alves MB, Reis TM, Desai M, Ross MG, Silveira PP. Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats. *Brain Res.* 2015a; 27; 1618:41-9.

Dalle Molle R, Bischoff AR, Portella AK, Silveira PP. The fetal programming of food preferences: current clinical and experimental evidence. *J Dev Orig Health Dis.* 2015b; 28:1-9.

Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science.* 1994; 264(5162):1102-5.

Davies AA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Litchfield P. Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees. *Circulation.* 2004; 110:1258-62.

Davis JF, Tracy A L, Schurdak JD, Tschöp MH, Lipton JW, Clegg DJ, Benoit SC. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behav Neurosci.* 2008; 122, 1257-1263.

Davis LM, Michaelides M, Cheskin LJ, Moran TH, Aja S, Watkins PA, Pei Z, Contoreggi C, McCullough K, Hope B, Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK. Bromocriptine administration reduces hyperphagia and adiposity and differentially affects dopamine D2 receptor and transporter binding in leptin-receptor-deficient Zucker rats and rats with diet-induced obesity. *Neuroendocrinology.* 2009; 89:152–162.

Dennison E, Syddall H, Sayer A, Gilbody HJ, Cooper C. Birth weight and weight at 1 year are independent determinants of bone mass in the seventh decade: The Hertfordshire cohort study. *Pediatric Research.* 2005; 57:582-6.

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(1): R91-6.

Desai M, Gayle D, Han G, Ross MG. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci*. 2007a; 14, 329–337.

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. The Timing of Nutrient Restriction During Rat Pregnancy/Lactation Alters Metabolic Syndrome Phenotype. *Am J Obstet Gynecol*. 2007b; 196(6): 555.e1-7.

Desai M, Li T, Ross MG. Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: neurotrophic effects of leptin and insulin. *Brain Res*. 2011a; 1378:29-42.

Desai M, Ross MG. Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet. *Semin Reprod Med*. 2011b; 29(3):237-45.

Diamond A. Executive Functions. *Annu Rev Psychol*. 2013; 64: 135–168.

Dohle S, Rall S, Siegrist M. I cooked it myself: Preparing food increases liking and consumption. *Food Quality and Preference*. 2014; 33, 14e16.

Dohle S, Rall S, Siegrist M. Does self-prepared food taste better? Effects of food preparation on liking. *Health Psychology*. 2016; 35(5), 500e508.

Dohle S, Diel K, Hofmann W. Executive functions and the self-regulation of eating behavior: A review. *Appetite*. 2017; pii: S0195-6663(17)30160-5.

Dressler H, Smith C. Food choice, eating behavior, and food liking differs between lean/normal and overweight/obese, low-income women. *Appetite*. 2013; 65:145-52.

Drewnowski A, Krahn DD, Demitrack MA, Nairn K, Gosnell BA. Taste responses and preferences for sweet high-fat foods: evidence for opioid involvement. *Physiol Behav*. 1992; 51(2):371-9.

Dum, J., Gramsch, C., Herz, A. Activation of hypothalamic beta-endorphin pools by reward induced by highly palatable food. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1983; 18, 443e447.

Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J. Comp. Neurol.* 1998; 402, 442e459.

Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distribution of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1998; 395, 535e547.

Elmquist JK, Elias C, Saper C. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* 1999; 22, 221e232.

Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Jaddoe VW, Osmond C, Barker DJ. Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia.* 2002; 45:342-8.

Fantino M, Hosotte J, Apfelbaum M. An opioid antagonist, naltrexone, reduces preference for sucrose in humans. *Am J Physiol.* 1986; 251(1 Pt 2): R91-6.

Feldman R, Eidelman AI. Neonatal state organization, neuromaturation, mother-infant interaction, and cognitive development in small-for-gestational-age premature infants. *Pediatrics.* 2006; 118: E869–78.

Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 2003; 964, 107–115.

Figlewicz DP, Bennett JL, Naleid AM, Davis C, Grimm JW. Intraventricular insulin and leptin decrease sucrose self-administration in rats. *Physiol Behav.* 2006; 89(4):611–16.

Figlewicz DP, Macdonald Naleid A, Sipols AJ. Modulation of food reward by adiposity signals. *Physiol Behav.* 2007; 91(5):473-8.

Figlewicz DP, Benoit SC. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296(1): R9–R19.

Figlewicz DP, Bennett-Jay JL, Kittleson S, Sipols AJ, Zavosh A. Sucrose self-administration and CNS activation in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300(4):R876-84.

Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 204(4):288-300.

Fineberg NA, Potenza MN, Chamberlain SR, Berlin HA, Menzies L, Bechara A, Sahakian BJ, Robbins TW, Bullmore ET, Hollander E. Probing compulsive and impulsive behaviors, from animal models to endophenotypes: a narrative review. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35:591–604.

Floresco SB, Magyar O. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006; 188:567–585.

Florio P, Marinoni E, DiIorio R, Bashir M, Ciotti S, Sacchi R, Bruschetti M, Lituanica M, Serra G, Michetti F, Petraglia F, Gazzolo D. Urinary S100B Protein Concentrations Are Increased in Intrauterine Growth-Retarded Newborns. *Pediatrics*. 2006; 118(3):e747-54.

Ford CP, Mark GP, Williams JT. Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J Neurosci*. 2006;26(10):2788-97.

Fossella J, Green AE, Fan J. Evaluation of a structural polymorphism in the ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1) gene and the activation of executive attention networks. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci*. 2006;6, 71-78.

Fowden AL. The role of insulin in fetal growth. *Early Hum Dev*. 1992; 29(1-3):177-81.

Franzek, E J, Sprangers N, Janssens AC, Van Duijn CM, Van De Wetering BJ. Prenatal exposure to the 1944-45 Dutch ‘hunger winter’ and addiction later in life. *Addiction*. 2008;303: 433–438.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395(6704):763-70.

Fulton S, Woodside B, Shizgal P. Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science*. 2000; 287:125–128.

Fulton S, Richard D, Woodside B, Shizgal P. Food restriction and leptin impact brain reward circuitry in lean and obese Zucker rats. *Behav Brain Res*. 2004; 155:319–329.

Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*. 2006; 51(6):811-22.

Fulton S. Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol*. 2010; 31(1):85-103.

Funahashi H, Hori T, Shimoda Y, Mizushima H, Ryushi T, Katoh S, Shioda S. Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regul Pept*. 2000;92, 31–5.

Gardosi J, Chang A, Kalyan B, Sahota D, Symonds EM. Customised antenatal growth charts. *Lancet*. 1992; 339(8788):283-7.

Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*. 2009; 159:1193–1199.

Glass MJ, Grace M, Cleary JP, Billington CJ, Levine AS. Potency of naloxone's anorectic effect in rats is dependent on diet preference, *Am. J. Physiol*. 1996; 271: R217–R221.

Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development and patterns of disease. *Science*. 2004; 305(5691):1733-6.

Gordon CJ. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiology & Behavior*. 1990; 47(5):963-991.

Gordon CJ. Temperature regulation in laboratory rodents. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom, 1993.

Green AS, Rozance PJ, Limesand SW. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *J Endocrinol*. 2010; 205(3):211-24.

Guerrieri R, Nederkoorn C, Stankiewicz K, Alberts H, Geschwind N, Martijn C, Jansen A. The influence of trait and induced state impulsivity on food intake in normal-weight healthy women. *Appetite*. 2007; 49(1), 66e73

Guerrieri R, Nederkoorn C, Jansen A. The interaction between impulsivity and a varied food environment: Its influence on food intake and overweight. *International Journal of Obesity*. 2008; 32(4), 708e714.

Gugusheff JR, Ong ZY, Muhlhausler BS. The early origins of food preferences: targeting the critical windows of development. *FASEB J.* 2015; 29:365–373.

Gunstad J, Paul RH, Cohen RA, Tate DF, Spitznagel MB, Gordon E. Elevated body mass index is associated with executive dysfunction in otherwise healthy adults. *Compr Psychiat.* 2007; 48:57–61.

Hagger MS, Panetta G, Leung CM, Wong GG, Wang JC, Chan DK, Keatley DA, Chatzisarantis NL. Chronic inhibition, self-control and eating behavior: test of a 'resource depletion' model. *PLoS One.* 2013;8(10):e76888.

Hales CN, Barker DJP, Clark PMS, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose-tolerance at age 64. *Br Med J.* 1991; 303:1019–22.

Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001; 60:5-20.

Hales CN, Barker DJ. Type2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992; 35(7):595-601.

Hall PA. Executive control resources and frequency of fatty food consumption: Findings from an age-stratified community sample. *Health Psychology.* 2012; 31(2), 235e241.

Hamlin RP, McNeill LS, Moore V. The impact of front-of-pack nutrition labels on consumer product evaluation and choice: An experimental study. *Public Health Nutrition.* 2015; 18, 2126–2134.

Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology.* 2012; 63(1):3-17.

Hartmann C, Dohle S, Siegrist M. Importance of cooking skills for balanced food choices. *Appetite.* 2013; 65, 125e131.

Hayward MD, Pintar JE, Low MJ. Selective reward deficit in mice lacking beta-endorphin and enkephalin. *J. Neurosci.* 2002; 22: 8251–8258.

Hayward MD, Schaich-Borg A, Pintar JE, Low, M.J. Differential involvement of endogenous opioids in sucrose consumption and food reinforcement, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006; 85: 601–611.

Hayward MD, Low MJ. The contribution of endogenous opioids to food reward is dependent on sex and background strain, *Neuroscience*. 2007; 144: 17–25.

Heinonen K, Räikkönen K, Pesonen AK, Andersson S, Kajantie E, Eriksson JG, Wolke D, Lano A. Behavioural symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder in preterm and term children born small and appropriate for gestational age: a longitudinal study. *BMC Pediatr*. 2010;10: 91.

Herman CP, Polivy J. External cues in the control of food intake in humans: the sensory-normative distinction. *Physiol Behav*. 2008; 94:722–728.

Hernandez L, Hoebel BG. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life Sci*. 1988; 42, 1705–1712.

Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992; 99(4):296-301.

Hofmann W, Adriaanse M, Vohs KD, Baumeister RF. Dieting and the self-control of eating in everyday environments: An experience sampling study. *British Journal of Health Psychology*. 2014; 19(3), 523e539.

Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*; 2006,51: 801–810.

Horvath TL, Diano S, Van den Pol AN. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J. Neurosci*. 1999; 19(3):1072-87.

Horvath TL, Diano S, Tschöp M. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist*. 2004;10(3):235-46.

Hovi P, Andersson S, Jarvenpaa A, Eriksson JG, Strang-Karlsson S, Kajantie E, Mäkitie O. Decreased Bone Mineral Density in Adults Born with Very Low Birth Weight: A Cohort Study. *PLoS Med*. 2009; 6(8): e1000135.

Houben K, Nederkoorn C, Jansen A. Eating on impulse: the relation between overweight and food-specific inhibitory control. *Obesity (Silver Spring)*. 2014; 22: E6–E8.

Huang XF, Zavitsanou K, Huang X, Yu Y, Wang H, Chen F, Lawrence AJ, Deng C. Dopamine transporter and D2 receptor binding densities in mice prone or resistant to chronic high fat diet-induced obesity. *Behav. Brain Res.* 2006; 175, 415–419.

Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci*; 2007,30:188–193.

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*. 1996; 35(11):1503-19.

Johnson SW, North RA. Opioid sex cite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci*. 1992;12(2):483-8.

Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat. Neurosci*. 2010; 13:635–641.

Jones A, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulden P, Phillips DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:1868-71.

Jones A, Beda A, Ward AM, Osmond C, Phillips DI, Moore VM, Simpson DM. Size at birth and autonomic function during psychological stress. *Hypertension*. 2007; 49:548-55.

Kajantie E, Raikkonen K. Early life predictors of the physiological stress response later in life. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010; 35:23-32.

Kaseva N, Wehkalampi K, Strang-Karlsson S, et al. Lower conditioning leisure-time physical activity in young adults born preterm at very low birth weight. *PLoS One*. 2012; 7, e32430.

Kelley AE. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2004; 27, 765–776.

Kheramin S, Body S, Ho MY, Velazquez-Martinez DN, Bradshaw CM, Szabadi E, Deakin JF, Anderson IM. Effects of orbital prefrontal cortex dopamine depletion on inter-temporal choice: a quantitative analysis. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004; 175:206–214.

Koenigstorfer J, Wąsowicz-Kiryło G, Styśko-Kunkowska M, Groeppel-Klein A. Behavioural effects of directive cues on front-of-package nutrition information: The combination matters! *Public Health Nutrition*. 2014; 17, 2115–2121.

Konner AC, Hess S, Tovar S, Mesaros A, Sánchez-Lasheras C, Evers N, Verhagen LA, Brönneke HS, Kleinridders A, Hampel B, Kloppenburg P, Brüning JC. Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell Metab.* 2011;13, 720–728.

Lahti J, Räikkönen K, Kajantie E, Heinonen K, Pesonen AK, Järvenpää AL, Strandberg T. Small body size at birth and behavioural symptoms of ADHD in children aged five to six years. *J Child Psychol Psychiatry.* 2006;47(11):1167-74.

Laitinen J, Pietilainen K, Wadsworth M, Sovio U, Järvelin MR Predictors of abdominal obesity among 31-years-old men and women born in Northern Finland in 1966. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58(1):180–190.

Laitinen J, Kiukaanniemi K, Heikkinen J, Koironen M, Nieminen P, Sovio U, Keinänen-Kiukaanniemi S, Järvelin MR. Body size from birth to adulthood and bone mineral content and density at 31 years of age: results from the northern Finland 1966 birth cohort study. *Osteoporosis International.* 2005; 16:1417-24.

Laureano DP, Dalle Molle R, Alves MB, Luft C, Desai M, Ross MG, Silveira PP. Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet taste in newborn pups - Role of the accumbal μ -opioid receptors. *Neuroscience.* 2016;13; 322:500-8.

Laurén L, Järvelin MR, Elliott P, Sovio U, Spellman A, McCarthy M, Emmett P, Rogers I, Hartikainen AL, Pouta A, Hardy R, Wadsworth M, Helmsdal G, Olsen S, Bakoula C, Lekea V, Millwood I; EURO-BLCS Study Group. Relationship between birthweight and blood lipid concentrations in later life: evidence from the existing literature. *Int J Epidemiol.* 2003; 32:862-76.

Laursen TM, Munk-Olsen T, Nordentoft M, Bo Mortensen P. A comparison of selected risk factors for unipolar depressive disorder, bipolar affective disorder, schizoaffective disorder, and schizophrenia from a danish population-based cohort. *J Clin Psychiatry.* 2007;68(11):1673-81.

Law CM, Shiell AW, Newsome CA, Syddall HE, Shinebourne EA, Fayers PM, Martyn CN, de Swiet M. Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age. *Circulation.* 2002; 105(9):1088-92.

Leigh SJ, Morris MJ. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. *Biol Psychol.* 2016; pii: S0301-0511(16)30376-3.

Leitner Y, Fattal-Valevski A, Geva R, Eshel R, Toledano-Alhadeef H, Rotstein M, Bassan H, Radianu B, Bitchonsky O, Jaffa AJ, Harel S. Neurodevelopmental outcome of children with

intrauterine growth retardation: a longitudinal, 10-year prospective study. *J Child Neurol.* 2007; 22:580–7.

Lent R. *Cem bilhões de neurônios?: conceitos fundamentais de neurociência.* São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

Levin BE. Metabolic sensors: viewing glucose neurons from a broader perspective. *Physiol. Behav.* 2002; 76(3):397-401.

Levin BE. Metabolic sensing neurons and the control of energy homeostasis. *Physiol Behav.* 2006;89(4):486-9.

Logue SF, Gould TJ. The neural and genetic basis of executive function: attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014; 123:45–54.

Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature.* 1977; 267(5611):495-9. *FEBS Lett.* 1994;14;341(1):33-8.

Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88:1648-1652.

Lynch WC, Libby L. Naloxone suppresses intake of highly preferred saccharin solutions in food deprived and sated rats, *Life Sci.* 1983; 33: 1909–1914.

MacDonald AF, Billington CJ, Levine AS. Alterations in food intake by opioid and dopamine signaling pathways between the ventral tegmental area and the shell of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 2004; 1018:225–31.

Majeed NH, Przewlocka B, Wedzony K, Przewlocki R. Stimulation of food intake following opioid microinjection into the nucleus accumbens septi in rats, *Peptides.* 1986; 7:711–716.

Matsuda M, Liu Y, Mahankali S, Pu Y, Mahankali A, Wang J, DeFronzo RA, Fox PT, Gao JH. Altered hypothalamic function in response to glucose ingestion in obese humans. *Diabetes.* 1999; 48:1801–1806.

Mebel DM, Wong JC, Dong YJ, Borgland SL. Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. *Eur.J.Neurosci.*2012; 36, 2336–2346.

Meguid MM, Yang Z-J, Koseki M. Eating induced rise in LHA-dopamine correlates with meal size in normal and bulbectomized rats. *Brain Res Bull.* 1995; 36:487

Meguid MM, Yang ZJ, Laviano A. Meal size and number: relationship to dopamine levels in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol.* 1997;272(6 Pt 2):R1925-30.

Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi-Fanelli F. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition.* 2000;16(10):843-57.

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature.* 1995;377(6549):532-5.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, and Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev;* 1998, 78:189–225.

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 1994; 341:33–38.

Morrison JL, Duffield JA, Muhlhausler BS, Gentili S, McMillen IC. Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25(4):669-77.

Mucellini AB, Borges MB, Salvador APA, Laureano DP, Alves MB, Silveira PP; Manfro GG. Fetal restriction associated with post-natal high-fat and sugar diet alters food recognition and hippocampal protein expression. 2017. In preparation.

Mucha RF, Iversen SD. Increased food intake after opioid microinjections into nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat, *Brain Res.* 1986; 397: 214–224.

Nederkoorn C, Braet C, Van Eijs Y, Tanghe A, Jansen A. Why obese children cannot resist food: The role of impulsivity. *Eating Behaviors.* 2006; 7(4), 315e322.

Nederkoorn C, Jansen E, Mulkens S, Jansen A. Impulsivity predicts treatment outcome in obese children. *Behaviour Research and Therapy.* 2007; 45(5), 1071e1075.

Nederkoorn C, Guerrieri R, Havermans RC, Roefs A, Jansen A. The interactive effect of hunger and impulsivity on food intake and purchase in a virtual supermarket. *International Journal of Obesity*. 2009; 33(8), 905e912.

Nederkoorn C, Houben K, Hofmann W, Roefs A, Jansen A. Control yourself or just eat what you like? Weight gain over a year is predicted by an interactive effect of response inhibition and implicit preference for snack foods. *Health Psychology*. 2010; 29, 389–393.

Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat. Neurosci*. 2005; 8, 1445–1449.

Noel MB, Wise RA. Ventral tegmental injections of morphine but not U-50, 488H enhance feeding in food-deprived rats, *Brain Res*. 1993; 632: 68–73.

Ong ZY, Muhlhausler BS. Consuming a low-fat diet from weaning to adulthood reverses the programming of food preferences in male, but not in female, offspring of 'junk food'-fed rat dams. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;210(1):127-41.

Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, de Groot E, Stok WJ, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP, Roseboom TJ. Maternal nutrition during gestation and carotid arterial compliance in the adult offspring: the Dutch famine birth cohort. *J Hypertens*. 2007; 25:533-40.

Paquet C, de Montigny L, Labban A, Buckeridge D, Ma Y, Arora N, Dubé L. The moderating role of food cue sensitivity in the behavioral response of children to their neighborhood food environment: a cross-sectional study. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2017;14(1):86.

Patterson TA, Brot MD, Zavosh A, Schenk JO, Szot P, Figlewicz DP. Food deprivation decreases mRNA and activity of the rat dopamine transporter. *Neuroendocrinology*. 1998; 68:11–20.

Peleg FD, Kennedy CM, Hunter SK. Intrauterine Growth Restriction: Identification and Management. *Am Fam Physician*. 1998; 58(2):453-60, 466-7.

Pert CB, Snyder SH. *Science*. 1973; 179: 1011–14.

Philipps AF, Rosenkrantz TS, Clark RM, Knox I, Chaffin DG, Raye JR. Effects of fetal insulin deficiency on growth in fetal lambs. *Diabetes*. 1991; 40:20-27.

Polonsky KS, Given E, and Carter V. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest.* 1988; 81(2):442-8.

Portella AK, Silveira PP. Neurobehavioral determinants of nutritional security in fetal growth-restricted individuals. *Ann N Y Acad Sci.* 2014; 1331, 15–33.

Reed DR, Bachmanov, A. A., Beauchamp, G. K., Tordoff, M. G., & Price, A. R. Heritable variation in food preferences and their contribution to obesity. *Behavior Genetics.* 1997; 27, 373–387.

Rice F, Harold GT, Thapar A. The effect of birth-weight with genetic susceptibility on depressive symptoms in childhood and adolescence. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2006; 15:383-91.

Richardson NR, Gratton A. Behavior-relevant changes in nucleus accumbens dopamine transmission elicited by food reinforcement: an electrochemical study in rat. *J. Neurosci.* 1996; 16, 8160–8169.

Ritchie T, Noble EP. Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. *Neurochem. Res.* 2003; 28, 73-82.

Rogers RD. The roles of dopamine and serotonin in decision making: evidence from pharmacological experiments in humans. *Neuropsychopharmacology.* 2011; 36(1):114-32.

Rotstein M, Stolar O, Uliel S, Mandel D, Mani A, Dollberg S, Reifen R, Steiner JE, Harel S, Leitner Y. Facial Expression in Response to Smell and Taste Stimuli in Small and Appropriate for Gestational Age Newborns. *J Child Neurol.* 2015;30(11):1466-71.

Salamone JD, Correa M. Dopamine and food addiction: lexicon badly needed. *Biol. Psychiatry.* 2013;73, e15–e24.

Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Tsuji T, Masuzaki H, Hiraoka J, Okazaki T, Tamaki M, Hayase M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats. *Endocrinology.* 1997; 138(3): 947-54.

Schoenbaum G, Roesch MR, Stalnaker TA. Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends Neurosci.* 2006; 29:116–124.

Schreuder M, Delemarre-van de Waal H, van Wijk A. Consequences of intrauterine growth restriction for the kidney. *Kidney Blood Press Res.* 2006; 29(2):108-25.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control and food intake. *Nature.* 2000; 404(6778):661-71.

Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J Physiol.* 2009;587(Pt 14):3453-8.

Sears B, Perry M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health Dis.* 2015; 14: 121.

Sibley DR. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 1999,39:313–341.

Silveira PP, Agranonik M, Faras H, Portella AK, Meaney MJ, Levitan RD; Maternal Adversity, Vulnerability and Neurodevelopment Study Team. Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. *Pediatr Res.* 2012; 71(3):293-8.

Singhal A, Fewtrell M, Cole TJ, Lucas A. Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet.* 2003; 361(9363):1089–1097.

Sipols AJ, Stuber GD, Klein SN, Higgins MS, Figlewicz DP. Insulin and raclopride combine to decrease short-term intake of sucrose solutions. *Peptides.* 2000;21: 1361–1367.

Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage.* 2003; 19:1709–15.

Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol. Neonate* 1990; 57:107–18.

Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, Meyerhoff JL. The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry.* 1970;127:199–207.

Stahl SM. *Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications.* 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science*. 2008a;322, 449-452.

Stice E, Spoor S, Bohon C, Veldhuizen M, Small DM. Relation of reward from food intake and anticipated intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study. *J. Abnorm Psychol*. 2008b;117, 924-935.

Stice E, Yokum S, Blum K, Bohon C. Weight gain is associated with reduced striatal response to palatable food. *J Neurosci*. 2010;30(39):13105-9.

Stice E, Yokum S, Zald D, Dagher A. Dopamine-based reward circuitry responsivity, genetics, and overeating. *Curr. Top Behav. Neurosci*. 2011; 6, 81-93.

Stice E, Figlewicz DP, Gosnell BA, Levine AS, Pratt WE. The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(9 Pt A):2047-58.

Stouffer MA, Woods CA, Patel JC, Lee CR, Witkovsky P, Bao L, Machold RP, Jones KT, de Vaca SC, Reith ME, Carr, KD, Rice ME. Insulin enhances striatal dopamine release by activating cholinergic interneurons and thereby signals reward. *Nat. Commun*. 2015; 6, 8543.

Strang-Karlsson S, Räikkönen K, Pesonen AK, Kajantie E, Paavonen EJ, Lahti J, Hovi P, Heinonen K, Järvenpää AL, Eriksson JG, Andersson S. Very low birth weight and behavioral symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in young adulthood: the Helsinki study of very-low-birth-weight adults. *Am J Psychiatry*. 2008;165(10):1345-53.

Swami S. Executive functions and decision making: A managerial review. *IIMB Management Review*. 2013; 25, 203e212.

Szathmari M, Vasarhelyi B, Szabó M, Szabó A, Reusz GS, Tulassay T. Higher osteocalcin levels and cross-links excretion in young men born with low birth weight. *Calcif Tissue Int*. 2000; 67:429-33.

Thompson C, Syddall H, Rodin I, Osmond C, Barker DJ. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *Br J Psychiatry*. 2001; 179:450-5.

Tiedemann LJ, Schmid SM, Hettel J, Giesen K, Francke P, Büchel C, Brassen S. Central insulin modulates food valuation via mesolimbic pathways. *Nat Commun*. 2017; 8:16052.

Tuominen L, Tuulari J, Karlsson H, Hirvonen J, Helin S, Salminen P, Parkkola R, Hietala J, Nuutila P, Nummenmaa L. Aberrant mesolimbic dopamine-opiate interaction in obesity. *Neuroimage*. 2015; 122:80-6.

Van de Sande-Lee S, Velloso LA. Disfunção hipotalâmica na obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 2012; 56 (6): 341-350.

Van Meer F, Charbonnier L, Smeets PA. Food Decision-Making: Effects of Weight Status and Age. *Curr Diab Rep*. 2016;16(9):84.

Vickers MH, Breier BH, McCarthy D, Gluckman PD. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am J Phys Regul Integr Comp Phys*. 2003;285(1):R271–3.

Viggedal G, Lundalv E, Carlsson G, Kjellmer I. Neuropsychological follow-up into young adulthood of term infants born small for gestational age. *Med Sci Monitor*. 2004;10: Cr8– 16.

Vogt MC, Bruning JC. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism—from embryo to old age. *Trends Endocrinol. Metab*. 2013;24, 76–84.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Franceschi D, Wong C, Gatley SJ, Gifford AN, Ding YS, Pappas N. “Nonhedonic” food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse*. 2002; 44, 175–180.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Thanos PK, Logan J, Alexoff D, Ding YS, Wong C, Ma Y, Pradhan K. Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: possible contributing factors. *Neuroimage*. 2008; 42, 1537 – 1543.

Volkow ND, Wang G-J, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci*. 2011; 15(1): 37–46.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73:953-90.

Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet*. 2001; 357:354–357.

Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK, Fowler JS. Similarity between obesity and drug addiction as assessed by neurofunctional imaging: a concept review. *Addict Dis*. 2004; 23(3):39-53.

Waterland RA, Michels KB. Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:363-88.

Watt J. Interaction and development in the first year. II. The effects of intrauterine growth retardation. *Early Hum Dev.* 1986; 13:211–23.

Weller RE, Cook EW 3rd, Avsar KB, Cox JE. Obese women show greater delay discounting than healthy-weight women. *Appetite.* 2008; 51:563–9.

West-Eberhard MJ. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Ann Rev Ecol System.* 1989; 20:249.

Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S, Barrett-Connor E, Bhargava SK, Birgisdottir BE, Carlsson S, de Rooij SR, Dyck RF, Eriksson JG, Falkner B, Fall C, Forsén T, Grill V, Gudnason V, Hulman S, Hyppönen E, Jeffreys M, Lawlor DA, Leon DA, Minami J, Mishra G, Osmond C, Power C, Rich-Edwards JW, Roseboom TJ, Sachdev HS, Syddall H, Thorsdottir I, Vanhala M, Wadsworth M, Yarbrough DE. Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA.* 2008; 300:2886-97.

Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE. Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network, *J. Neurosci.* 2003; 23: 2882–2888.

Willcutt EG, Doyle AE, Nigg JT, Faraone SV, Pennington BF. Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biol. Psychiatry.* 2005; 57:1336–1346.

Williams G, Harrold JA, Cutler DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2000; 59(3):385-96.

Williams JM, Owens WA, Turner GH, Saunders C, Dipace C, Blakely RD, France CP, Gore JC, Daws LC, Avison MJ, Galli A. Hypoinsulinemia regulates amphetamine-induced reverse transport of dopamine. *PLoS Biol.* 2007; 5, e274.

Winstanley CA, Theobald DE, Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. Double dissociation between serotonergic and dopaminergic modulation of medial prefrontal and orbitofrontal cortex during a test of impulsive choice. *Cereb. Cortex.* 2006; 16:106–114.

Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*. 1998; 280(5368):1378-83.

Woods SC. Gastrointestinal satiety signals. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrintest Liver Physiol*. 2004; 286(1): G7-13.

Young AA. Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. *Neuropharmacology*. 2012; 63(1):31-45.

Zhang M, Kelley AE. Opiate agonists microinjected into the nucleus accumbens enhance sucrose drinking in rats, *Psychopharmacology (Berl.)*. 1997; 132: 350–360.

Zhang M, Gosnell BA, Kelley AE. Intake of high-fat food is selectively enhanced by mu opioid receptor stimulation within the nucleus accumbens, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 285: 908–914.

Zhang M, Kelley AE. Enhanced intake of high-fat food following striatal mu opioid stimulation: microinjection mapping and Fos expression, *Neuroscience*. 2000; 99: 267–277.

Zhen J, Reith MA, Carr KD. Chronic food restriction and dopamine transporter function in rat striatum. *Brain Res*. 2006; 1082, 98–101.

Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR. Orexin signaling in the ventral tegmental area is required for high-fat appetite induced by opioid stimulation of the nucleus accumbens, *J. Neurosci*. 2007; 27: 11075–11082.

Zhou QY, Palmiter RD. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipic, and aphagic. *Cell* 83. 1995; 1197–1209.

APÊNDICE A: ESTUDO DOS DIFERENTES MODELOS DE PROGRAMAÇÃO NEONATAL À OBESIDADE E SEUS EFEITOS SOBRE A VIA DA RECOMPENSA.

1 IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

- Modalidade: Doutorado Sanduíche no Exterior – SWE
- Vigência: 23 de março de 2016 a 31 de janeiro de 2017
- Orientadores no Exterior: Prof^a Dr^a Mina Desai e Prof^a Dr Michael G Ross
- Orientador no Brasil: Prof^a Dr^a Patrícia Pelufo Silveira
- Universidade onde foi realizado o Doutorado Sanduíche: University of California, Los Angeles - Los Angeles Biomedical Research Institute at Harbor-UCLA Medical Center.

2 METODOLOGIA

Há dois modelos usados nesse laboratório que programam o comportamento alimentar do indivíduo na vida adulta, podendo levar à hiperfagia e ao desenvolvimento de obesidade. O modelo de obesidade materna e o modelo de restrição de crescimento intrauterino.

2.1 Estudo piloto

Foi realizado um estudo piloto para padronizar a dissecação das estruturas encefálicas, núcleo accumbens e núcleo arqueado de camundongos adultos. Visto que no Brasil eu trabalhava com ratos e neste laboratório eles não conheciam essa técnica de dissecação, usavam apenas o criostato. Tive auxílio de um atlas para camundongo (Paxinos, Franklin, 2013), uma

lupa e gelo seco dentro de 2 placas de Petri, como descrito nos próximos itens. Utilizei 6 cérebros de descarte para treinar a localização.

Foi realizado 2 corridas de géis de Western blotting para a padronização da técnica, visto que no Brasil eu usava produtos de marcas diferentes. E posteriormente mais 2 corridas de géis de Western blotting para a padronização do anticorpo D2, acabamos seguindo as orientações do fabricante. A seguir a metodologia final completa (item 2.4.1).

2.2 Modelo de Indução de Obesidade Materna

O estudo foi aprovado pelo *Animal Research Committee of the Los Angeles Biomedical Research Institute* em Harbor UCLA e estão de acordo *American Association of Accreditation of Laboratory Care and National Institutes of Health Guidelines*. Camundongos da linhagem C57BL/6J foram mantidos em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, limpeza das caixas uma vez por semana, ração padrão e água *ad libitum*. Imediatamente após o desmame camundongos fêmeas começaram a receber a dieta hiperlipídica (High fat - HF; 60% kcal fat, Research Purified Diet 1249258Y1, New Brunswick) ou Controle (10% kcal fat, Research Purified Diet 12450B58Y2, New Brunswick). Previamente ao acasalamento (que ocorreu aos 3 meses de vida), foi verificado o ciclo estral de cada animal, através da visualização em microscopia, do material vaginal coletado. Após a confirmação do período fértil, camundongos fêmeas foram colocados junto com machos da mesma idade, da mesma raça, durante o ciclo escuro, para permitir o acasalamento. Após a confirmação do acasalamento (microscopia), que foi considerado o dia 0 (zero) de gestação. Os camundongos fêmeas continuaram recebendo suas respectivas dietas durante a gestação e lactação. As ninhadas foram padronizadas em 6 filhotes (3 machos e 3 fêmeas). O desmame e sexagem ocorreram aos 21 dias de vida e os filhotes foram divididos em 2 grupos: dieta hiperlipídica - High fat (HF; 60% kcal fat, Research Purified Diet 1249258Y1, New Brunswick) ou Controle (10% kcal fat, Research Purified Diet 12450B58Y2, New Brunswick) formando os seguintes grupos (dieta da mãe/dieta que a prole começou a receber no desmame): controle-controle (C-C), high fat-controle (HF-C), controle-high fat (C-HF), high fat-high fat (HF-HF). Após o desmame, os animais foram mantidos intactos até a eutanásia (aos 14 meses), onde ocorreu a dissecação e pesagem de gordura corporal e abdominal (Desai *et al.*, 2016).

2.3 Modelo de Restrição de Crescimento Intrauterino

O estudo foi aprovado pelo *Animal Research Committee of the Los Angeles Biomedical Research Institute* em Harbor UCLA e estão de acordo *American Association of Accreditation of Laboratory Care and National Institutes of Health Guidelines*. Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J de aproximadamente 3 meses de vida foram mantidos em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, limpeza das caixas uma vez por semana, ração padrão e água *ad libitum*. Previamente ao acasalamento, foi verificado o ciclo estral de cada animal, através da visualização em microscopia, do material vaginal coletado. Após a confirmação do período fértil, camundongos fêmeas foram colocados junto com machos da mesma idade e mesma linhagem, durante o ciclo escuro, para permitir o acasalamento. Após a confirmação do acasalamento (microscopia), que foi considerado o dia 0 (zero) de gestação, camundongos fêmeas prenhes foram randomizados pelo peso corporal, mantidos individualmente. No dia 7 de gestação os animais foram colocados em 2 tipos de salas diferentes: temperatura normal (a temperatura foi mantida entre 68 a 72° Fahrenheit – 20 a 22° Celsius) e temperatura aumentada (a temperatura foi mantida a aproximadamente 88° Fahrenheit – 31° Celsius) com o objetivo de avaliar a diferença de temperatura sobre o metabolismo - termoneutralidade (Gordon, 1990; Gordon, 1993). No dia 10 de gestação os camundongos fêmeas foram divididos em Controle – recebendo ração padrão à vontade durante a gestação e restrição alimentar de 30% (*food restriction – FR*) - camundongos fêmeas recebendo 70% do consumo médio de ração do grupo controle (Desai *et al.*, 2007b). A dieta usada durante esse experimento foi ração controle (13,427% kcal de gordura, Laboratory Rodent Diet, 5001, LabDiet, St Louis, MO). No dia do nascimento da prole todas as mães voltaram a receber ração à vontade. As ninhadas foram padronizadas em 6 filhotes (3 machos e 3 fêmeas). O desmame ocorreu no dia 21, sendo os animais separados por sexo e mantidos em 3 por caixa, intactos até a eutanásia para posterior análises bioquímicas, aos 32 e 42 semanas de idade (8 e 10 meses). A ninhada permaneceu nas suas respectivas salas (temperatura normal ou aumentada) durante toda sua vida. Foi usado nesse estudo apenas machos, as fêmeas foram utilizadas em outros trabalhos desse grupo de pesquisa (um estudo da pesquisadora Guan Han).

2.4 Análises Bioquímicas

2.4.1 Western Blotting

Aos 8 e 10 meses (modelo de restrição) ou 14 meses (modelo de obesidade materna) de idade os animais foram anestesiados, o sangue foi coletado através de punção cardíaca, e então decapitados para a dissecação do encéfalo. Os animais ficaram em jejum durante toda a noite. O encéfalo foi rapidamente removido e congelado por imersão no nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até as análises. Posteriormente, os cérebros foram descongelados até -20°C e, foram realizados cortes coronais do encéfalo e retirados *punches* do núcleo accumbens (NAcc) e núcleo arqueado (ARC) (para o estudo da restrição de crescimento intrauterino foi usado somente NAcc). Para dissecar os cérebros foi feito um corte coronal de 0,15 cm com auxílio de um Atlas (Paxinos, Franklin, 2013) e microscópio. *Punches* bilaterais foram obtidos no núcleo arqueado (ARC) (coordenadas: 1,43 a 1,67 mm posterior ao bregma; 0,1 a 0,25 mm lateral à linha média, e 5,75 mm ventral à superfície do córtex) e núcleo accumbens (NAcc) (coordenadas: 1,21 a 0,97 mm anterior ao bregma; 0,5 mm lateral à linha média, e 4.0 mm ventral à superfície do córtex) (Shahrokh *et al.*, 2010). Essas amostras foram armazenadas a -80°C e utilizadas para a quantificação da expressão proteica por Western blotting.

Foi realizado um *pool* de amostras, juntei tecido de 2 animais e fiz 1 amostra, devido a pequena quantidade de proteína encontrada no estudo piloto. As amostras foram homogeneizadas com 28 μL da solução: 0,5 mL de Ripa (Ripa Lysis Buffer, Santa Cruz Biotechnology, sc-24948A) + água destilada 2 mL + 25 μL de inibidor de protease (Halt protease inhibitor cocktail, Thermo scientific, #1862209), + 25 μL de inibidor de fosfatase (Halt phosphatase inhibitor cocktail, Thermo scientific, #1862495) + 2,5 μL fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 30 minutos a $+4^{\circ}\text{C}$. Parte do sobrenadante (2 μL) foi utilizada para quantificar a proteína total, utilizando-se um kit BCA com albumina bovina como padrão (Pierce BCA Protein, Termo Scientific, 23225). Quantidade suficiente do sobrenadante, que continha 30 μg de proteína foi adicionada a *XT reducing agent 20X* (Bio-Rad, #161-0792) e *XT sample buffer 4X* (Bio-Rad, #161-0791) incubadas a 100°C por 5 minutos e logo após deixadas no gelo por pelo menos 2 minutos antes da pipetagem (as amostras para o Western blotting são preparadas no mesmo dia da corrida do gel). Essas amostras e um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein Dual

Color Standards, Bio-Rad, #1610374) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (Criterion XT Precast gel 4-12% Bis-tris 18 well, Bio-Rad, #3450124) e, em seguida, transferidos para membranas de nitrocelulose (Trans-blot 0.45 μ M Transfer medium pure nitrocelulose membrane, Bio-Rad, #1620167). As membranas foram bloqueadas em leite desnatado 5% (Blotting grade blocker – nonfat milk, Bio-Rad, #170-6404) diluído em tampão Tris-Base (10x TBS, Bio-Rad, #170-6435) com 1% de Tween-20 (Bio-Rad, #170-6531). Para D2 o bloqueio e a incubação com o primário foram realizados com Albumina 5% (Sigma-Aldrich, A4503), os outros anticorpos todos foram incubados diluídos em leite desnatado 5%. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário. No dia seguinte, foram incubadas por 1h com o anticorpo secundário (Goat anti-rabbit 1:2500, Bio-Rad, #1706515) ou (Goat anti-mouse 1:2500, Bio-Rad, #1706516) e, em seguida, reveladas na câmara escura após exposição de 5 minutos ao quimiluminescente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, 34080) sendo exposto imediatamente após ao filme (HyBlot CL™ Autoradiography Film, Denville Scientific, Inc., E3012,). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: SIRT1 (1:1000, Sigma-Aldrich, S5322), D2 (anti-dopamine D2 receptor, 1:1000, Millipore, AB5084P), TH (anti-tirosina hidroxilase, 1:2000, Millipore, MAB318). Para comparar os resultados das proteínas de interesse com uma proteína padrão, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário para β -Tubulina-III (1:5000, Sigma-Aldrich, T8578) e no dia seguinte com o respectivo secundário (Goat anti-mouse 1:2500, Bio-Rad, #1706516). As densidades das bandas foram determinadas pelo densitômetro (GS-800 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-rad, USA) e a intensidade das mesmas foram calculadas com auxílio do programa ImageJ® (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), disponível gratuitamente *on line*. Os resultados foram expressos como a razão entre as proteínas de interesse e a β -Tubulina. As comparações foram realizadas somente entre amostras da mesma membrana (máximo 18 amostras por membrana) (Laureano *et al.*, 2016; Dalle Molle *et al.*, 2015a).

3 RESULTADOS OBTIDOS

Considerando as fêmeas submetidas ao protocolo de Indução de Obesidade Materna, as fêmeas do grupo high fat - Controle apresentaram maiores níveis de SIRT1 no NAcc comparado aos controles, *Teste t de Student* ($p=0,03$). Quanto a SIRT1 no ARC, não houve diferença entre os grupos, *Teste t de Student* ($p=0,516$). Não foi encontrando diferenças entre

os grupos em TH no NAcc (*Teste t de Student*, $p=0,115$) e no ARC (*Teste t de Student*, $p=0,143$). D2 no NAcc (*Teste t de Student*, $p=0,611$) e no ARC (*Teste t de Student*, $p=0,115$) também não foram diferentes entre os grupos.

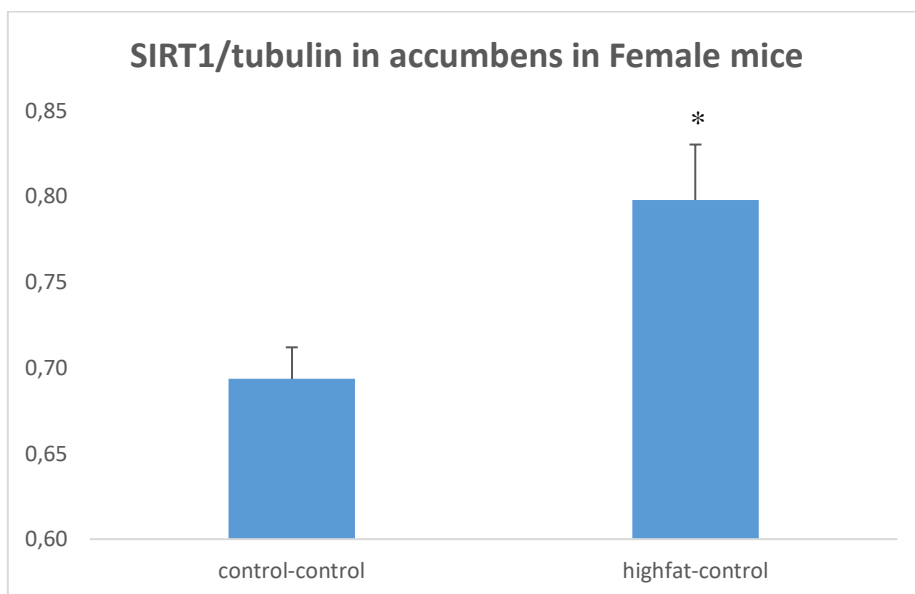


Figura 1: Razão SIRT1/tubulina no NAcc de camundongos fêmeas. Grupos controle/control (n=4) e HF/control (n= 3). *Teste t de Student* ($p=0,03$).

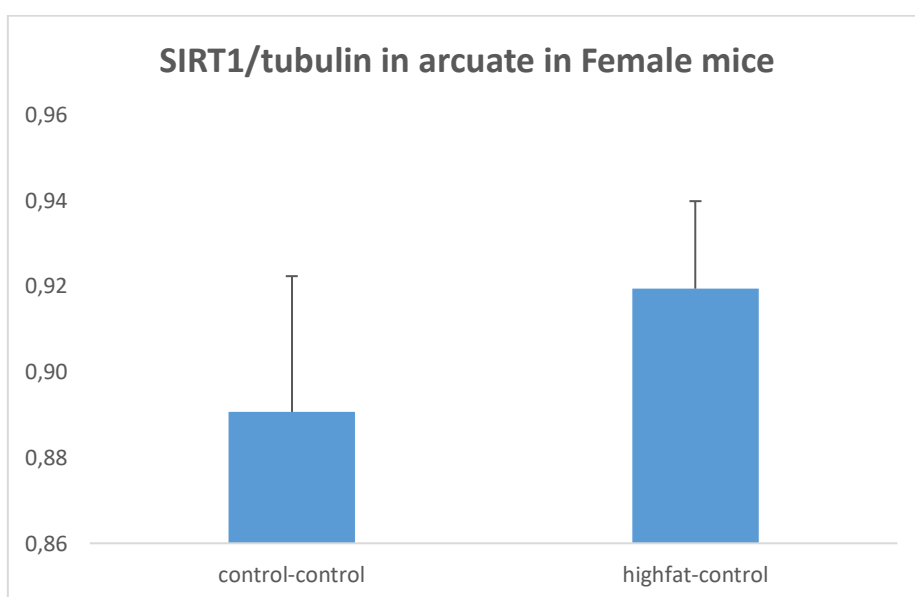


Figura 2: Razão SIRT1/tubulina no ARC de camundongos fêmeas. Grupos controle/control (n=4) e HF/control (n= 3). *Teste t de Student* ($p=0,516$).

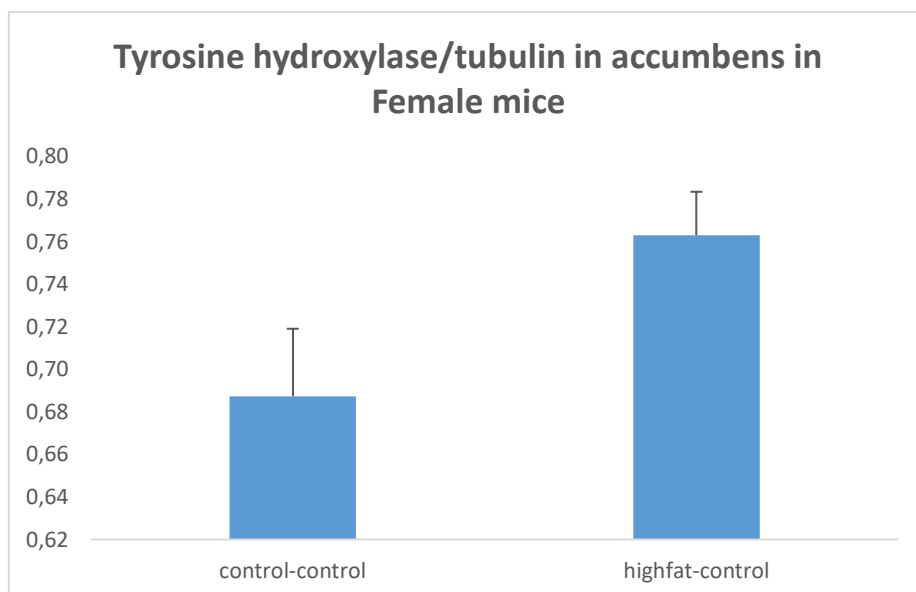


Figura 3: Razão TH/tubulina no NAcc de camundongos fêmeas. Grupos controle/control (n=4) e HF/control (n= 4). *Teste t de Student* (p=0,115).

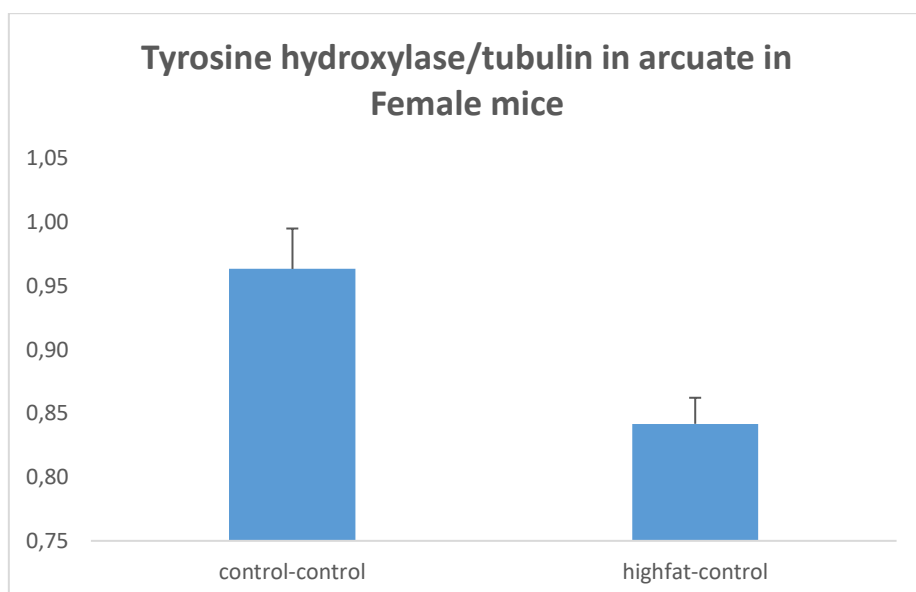


Figura 4: Razão TH/tubulina no ARC de camundongos fêmeas. Grupos controle/control (n=4) e HF/control (n= 4). *Teste t de Student* (p=0,143).

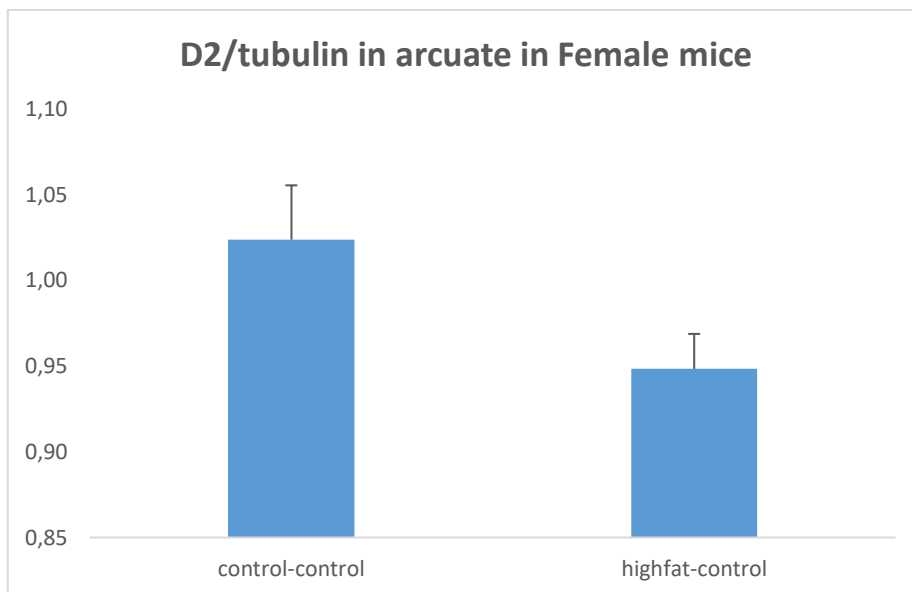


Figura 5: Razão D2/tubulina no ARC de camundongos fêmeas. Grupos controle/control (n=4) e HF/control (n= 4). *Teste t de Student* (p=0,115).

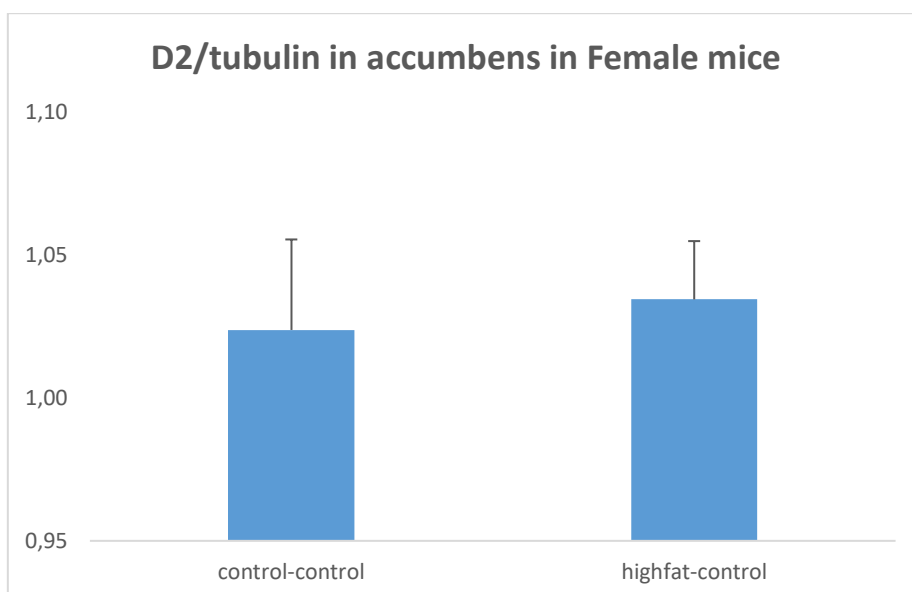


Figura 6: Razão D2/tubulina no NAcc de camundongos fêmeas. Grupos controle/control (n=4) e HF/control (n= 3). *Teste t de Student* (p=0,611).

Os camundongos machos submetidos ao protocolo de Indução de Obesidade Materna pertencem aos grupos Controle – high fat e High fat – High fat. SIRT1 no accumbens não foi diferente entre os grupos (*Teste t de Student*, p=0,147). Os níveis de tirosina hidroxilase no accumbens foi semelhante entre os grupos (*Teste t de Student*, p=0,079), no entanto foi encontrado um aumento no grupo High fat - High fat comparado ao Controle – High fat no arqueado, *Teste t de Student*, p=0,023. Encontramos o D2 no accumbens diminuído no grupo

High fat - High fat comparado ao Controle – High fat (*Teste t de Student*, $p=0,005$), mas não foi encontrado alterações no ARC, *Teste t de Student* ($p=0,325$).

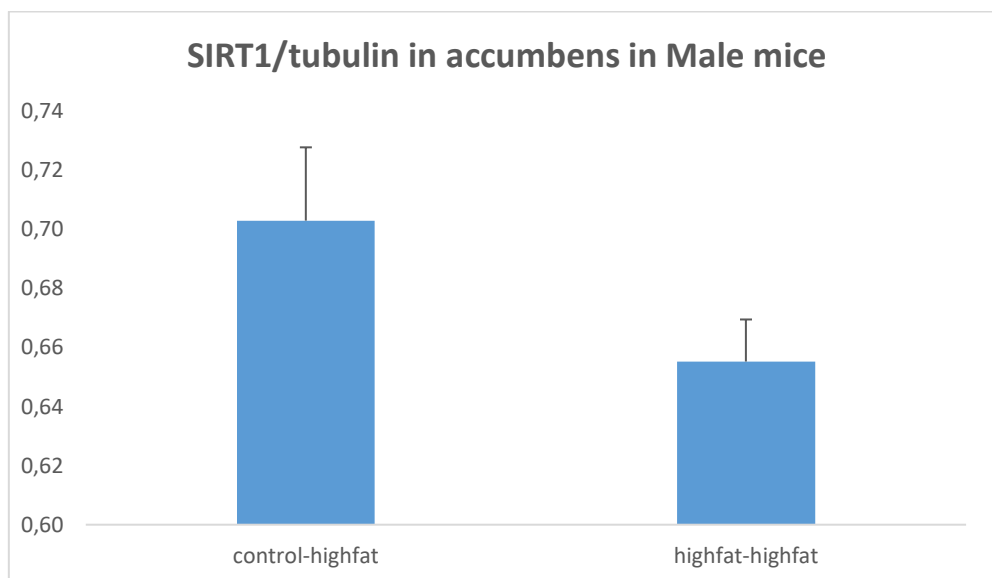


Figura 7: Razão SIRT1/tubulina no NAcc de camundongos machos. Grupos controle/HF (n=4) e HF/HF (n= 4). *Teste t de Student* ($p=0,147$).

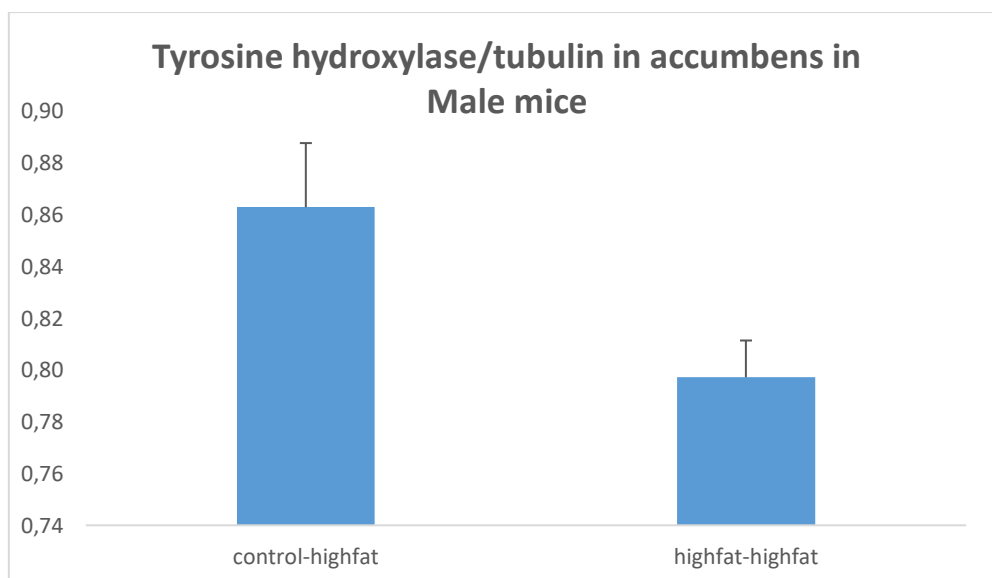


Figura 8: Razão TH/tubulina no NAcc de camundongos machos. Grupos controle/HF (n=4) e HF/HF (n= 4). *Teste t de Student* ($p=0,079$).

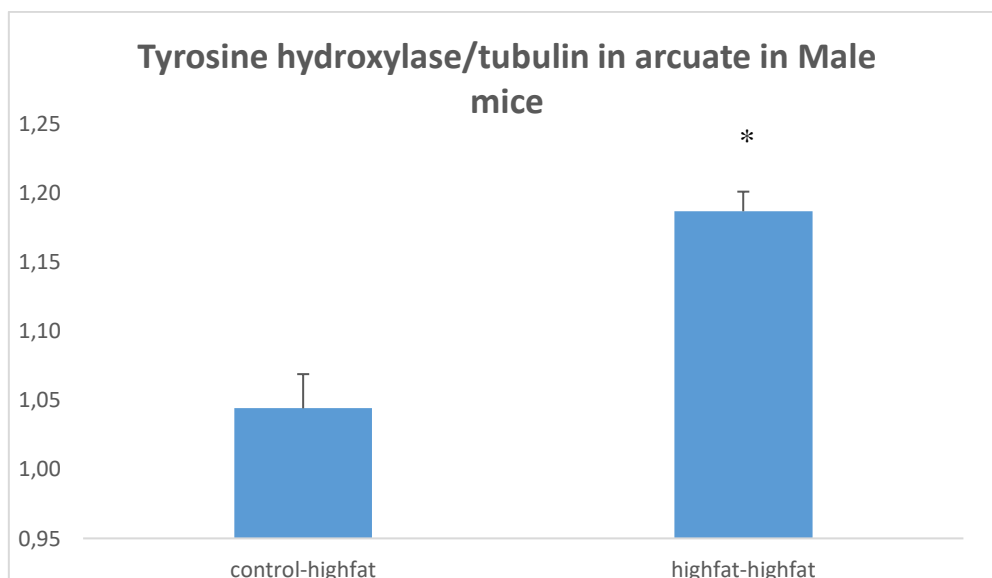


Figura 9: Razão TH/tubulina no ARC de camundongos machos. Grupos controle/HF (n=4) e HF/HF (n= 3). *Teste t de Student* (p=0,023).

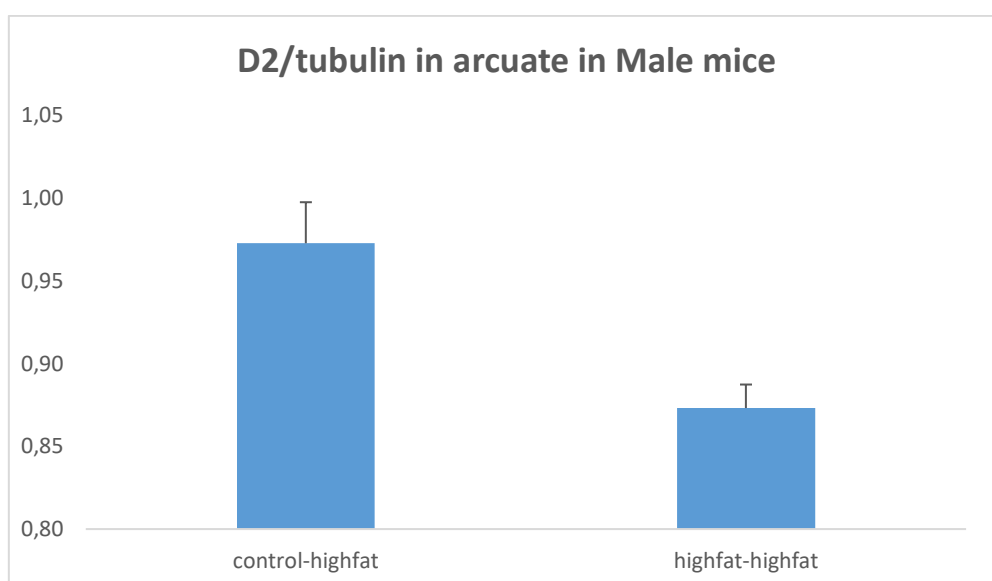


Figura 10: Razão D2/tubulina no ARC de camundongos machos. Grupos controle/HF (n=4) e HF/HF (n= 3). *Teste t de Student* (p=0,325).

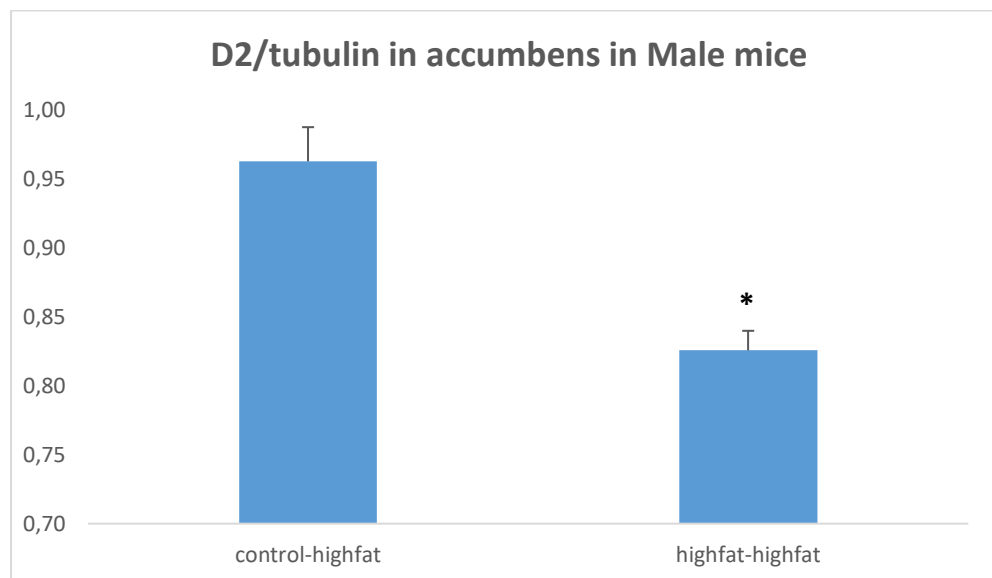


Figura 11: Razão D2/tubulina no NAcc de camundongos machos. Grupos controle/HF (n=4) e HF/HF (n= 4). *Teste t de Student* (p=0,005).

Foi realizado um Western Blotting no qual rodamos um gel do arqueado de camundongos machos (grupos High fat - High fat e Controle – High fat) e fêmeas (grupos High fat - Controle e Controle – Controle). A membrana foi incubada com peptídeo relacionado ao gene agouti - AgRP 1:5000 (GT15023, Neuromics) seguido de donkey anti-got IgG-HRP 1:2500 (SC-2020, Santa Cruz), mas não apareceu banda.

Foi realizado um *stripping* (incubação da membrana a 37°C por 15 min em solução de *stripping* – Restore Western Blotting Stripping Buffer, #21059, Thermo Scientific) seguido de um bloqueio de 1h com leite desnatado 5% (Blotting grade blocker – nonfat milk, Bio-Rad, #170-6404) diluído em tampão Tris-Base (10x TBS, Bio-Rad, #170-6435) com 1% de Tween-20 (Bio-Rad, #170-6531). Logo em seguida a membrana foi incubada com Pró-opiomelanocortina - POMC 1:500 (ABIN185387, Antibodies online) seguido de donkey anti-goat IgG-HRP 1:2500 (SC-2020, Santa Cruz) e novamente não apareceu banda.

Foi realizado um novo stripping seguido de bloqueio e foram realizadas novas tentativas de incubação com AgRP 1:5000 e POMC 1:500 (em pedaços diferentes da membrana), mas foi novamente sem sucesso.

No experimento de restrição de crescimento intrauterino os grupos foram divididos em grupo mãe (provenientes de mães controles ou FR) e grupo sala (animais que permaneceram em sala de temperatura normal ou aumentada), foi usado somente animais machos e realizado Western blotting apenas no accumbens desses animais. Considerando os níveis de tirosina hidroxilase, o grupo mãe FR apresentou um aumento comparado ao controle ($p=0,021$), o grupo sala foi semelhante ao controle grupo sala ($p=0,721$), não existiu interação ($p=0,130$), ANOVA de 2 vias. Foi encontrado diferenças entre os grupos na expressão proteica de SIRT1 no grupo mãe, FR é menor comparado ao grupo mãe controle ($p=0,011$), quanto ao grupo sala não houve diferenças ($p=0,065$), não existiu interação ($p=0,611$), ANOVA de 2 vias. Os níveis de D2 não foram diferentes, tanto grupo mãe ($p=0,768$), quanto grupo sala ($p=0,372$), não existiu interação ($p=0,385$), ANOVA de 2 vias.

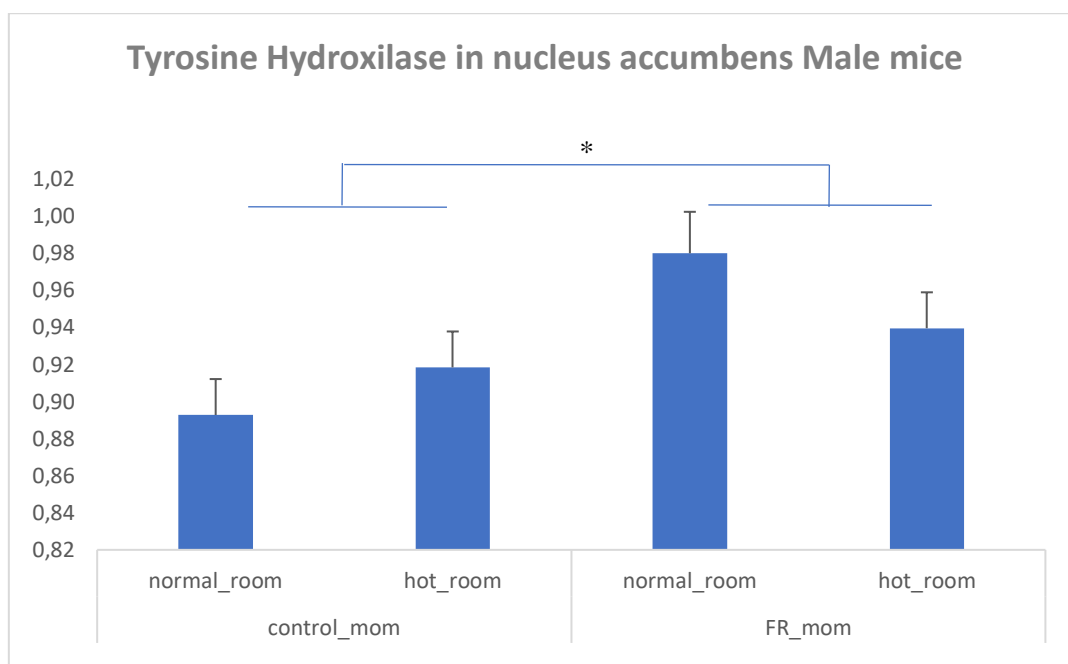


Figura 12: Razão TH/tubulina no NAcc de camundongos machos. Grupo mãe foi diferente ($p=0,021$), grupo mãe FR é maior comparado ao grupo mãe controle. Não existiu diferença no grupo sala ($p=0,721$). Não existiu interação ($p=0,130$). ANOVA de 2 vias.

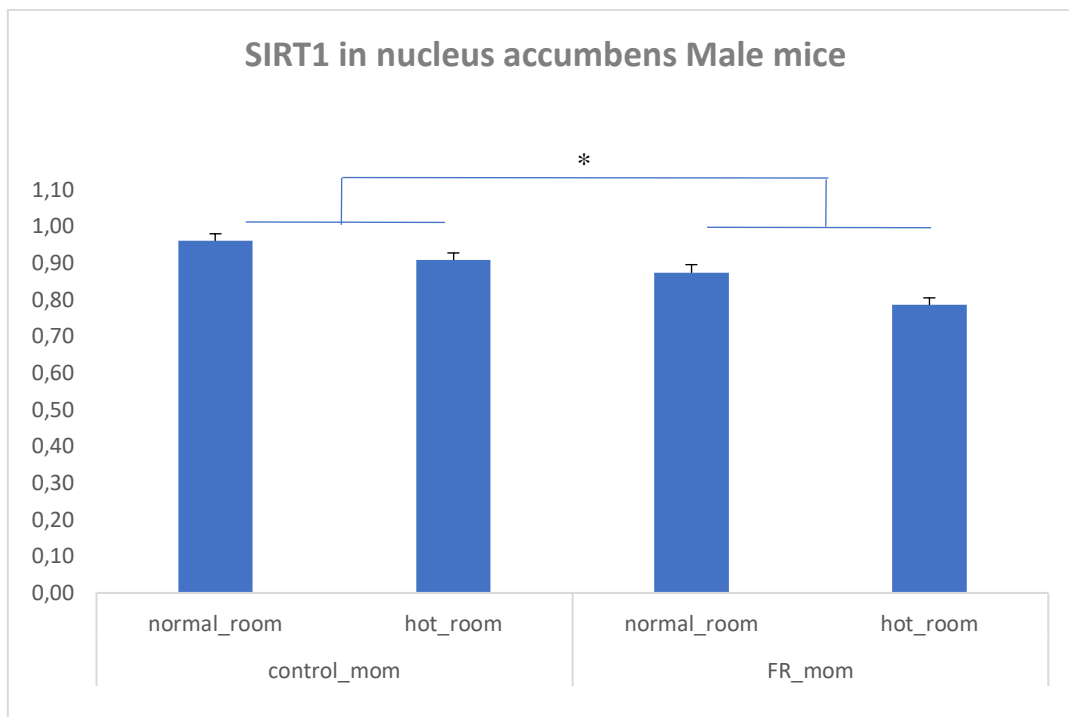


Figura 13: Razão SIRT1/tubulina no NAcc de camundongos machos. Grupo mãe foi diferente ($p=0,011$), grupo mãe FR é menor comparado ao grupo mãe controle. Não existiu diferença no grupo sala ($p=0,065$). Não existiu interação ($p=0,611$). ANOVA de 2 vias.

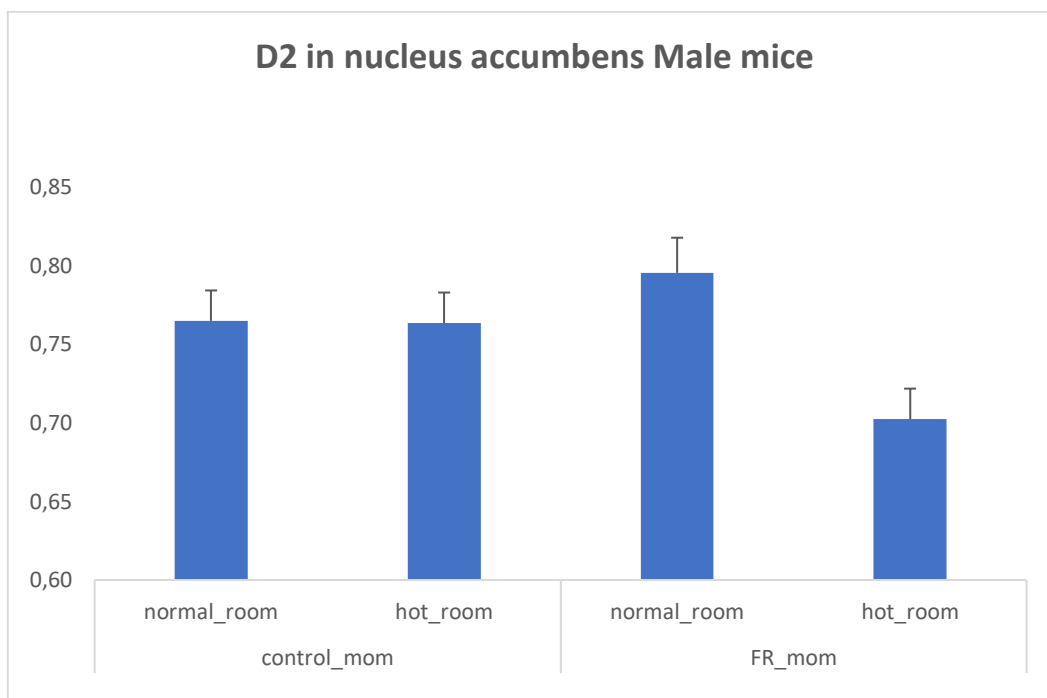


Figura 14: Razão D2/tubulina no NAcc de camundongos machos. Não existiu diferença no grupo mãe ($p=0,768$). Não existiu diferença no grupo sala ($p=0,372$). Não existiu interação ($p=0,385$). ANOVA de 2 vias.

4 Considerações em relação ao projeto de pesquisa executado

Esse projeto buscou estudar a via de recompensa focando no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico de animais submetidos à diferentes modelos de programação à obesidade, protocolo de obesidade materna e restrição de crescimento intrauterino.

Considerando os animais submetidos ao protocolo de obesidade materna em fêmeas no núcleo accumbens, SIRT1 apresentou maiores níveis no grupo HF - Controle comparado ao grupo Controle – Controle. A literatura tem mostrado que a administração crônica de cocaína induz o aumento de SIRT1 no núcleo accumbens, região chave da recompensa. A SIRT1 regula as ações da cocaína no núcleo accumbens (Ferguson *et. al.*, 2015), regula a secreção de insulina (Bordone *et. al.*, 2006), logo pode estar envolvida na regulação da via da recompensa. Mas não houve diferenças significativas nos valores de TH e D2. No ARC, não foram encontrados resultados significativos de SIRT1, TH e D2.

Camundongos machos do grupo HF – HF submetidos ao protocolo de obesidade materna apresentaram diminuição nos níveis de D2 no NAcc comparado ao grupo Controle-HF, demais parâmetros no NAcc não foram estatisticamente significativos. Provavelmente a dieta HF primeiramente hiperativou o sistema de recompensa causando uma posterior *downregulation* e dessensibilização dos receptores. No ARC os valores de tirosina hidroxilase foram aumentados no grupo HF - HF, não houve diferenças significativas em SIRT1 e D2. No sistema tuberoinfundibular neurônios dopaminérgicos do núcleo arqueado e núcleo periventricular projetam-se à eminência média e à hipófise. A dopamina nessa região está relacionada à regulação de prolactina, o que não é o foco deste estudo. Talvez tenha sido um equívoco ter estudado a via de recompensa através do hipotálamo (núcleo arqueado), a função do mesmo é principalmente a regulação homeostática e não hedônica do comportamento alimentar.

No modelo de obesidade podemos observar que a dieta HF crônica ofertada à mãe modificou a resposta do sistema do dopaminérgico mesolímbico de machos e fêmeas com uma provável hiperativação do mesmo, observado em fêmeas com o aumento de SIRT1 no grupo HF – Controle e nos machos com a diminuição de D2 no grupo HF - HF. No entanto é impossível fazer uma comparação direta entre machos e fêmeas pois usamos animais de grupos diferentes nos diferentes sexos.

Analisando os camundongos machos submetidos ao protocolo de restrição intrauterina podemos observar em relação à TH os animais FR apresentaram maiores níveis comparado aos

Controles, em relação a SIRT1 os animais FR apresentaram menores níveis e não houve diferença significativa em D2. Comparando as diferentes salas em que os animais ficaram alojados - temperatura normal e aumentada, não houve diferenças significativas entre os grupos, nesse estudo a diferença de temperatura não alterou significativamente o metabolismo.

O modelo de restrição de crescimento intrauterino alterou a via de recompensa a hiperativando, visto pelo aumento de TH, proteína limitante da síntese de dopamina, não havendo diferenças em D2 e diminuindo os níveis de SIRT1. Diferentemente do que ocorreu no modelo de indução de obesidade materna em machos no NAcc, onde os níveis de SIRT1 não foram diferentes entre os grupos, no modelo de restrição de crescimento intrauterino houve uma diminuição de SIRT1 em animais FR (foram utilizadas estatísticas diferentes nos diferentes protocolos, no modelo de restrição de crescimento intrauterino foi usado ANOVA de 2 vias e no modelo de indução de obesidade materna foi usado *Teste t de Student*). Possivelmente a ativação da via da dopaminérgica observada nos diferentes modelos ocorreu de maneiras diferentes.

É importante ressaltar a dificuldade em comparar diretamente dois modelos tão distintos, o modelo de obesidade materna e o de restrição de crescimento intrauterino. Esses dois modelos programam obesidade na idade adulta. Podemos concluir que esses dois modelos de diferentes maneiras modificam a via de recompensa. No entanto, mais estudos são necessários para responder essa questão.

Quanto as dificuldades encontradas durante a pesquisa, um ponto a ser levado em consideração é a falta de um teste comportamental para avaliar o padrão alimentar e comportamental dos animais, não é realizado esse tipo de teste nesse laboratório. Outro fator que devemos observar é a falta do acompanhamento nutricional e ponderal dos animais, não realizavam mensuração do consumo alimentar ou do ganho de peso do animal ao longo da vida, somente ao nascer e antes da eutanásia. Outra dificuldade encontrada foi a falta de planejamento prévio nas diferentes etapas da pesquisa, a dinâmica deste laboratório era diferente da que eu conhecia no Brasil, onde todos os passos dos experimentos são planejados previamente à execução do mesmo.

REFERÊNCIAS

Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, Mcburney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin S, Guarente L. Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic β Cells. *PLoS Biol.* 2006;4(2):e31.

Dalle Molle R, Laureano DP, Alves MB, Reis TM, Desai M, Ross MG, Silveira PP. Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats. *Brain Res.* 2015a; 27;1618:41-9.

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. The Timing of Nutrient Restriction During Rat Pregnancy/Lactation Alters Metabolic Syndrome Phenotype. *Am J Obstet Gynecol.* 2007b; 196(6): 555.e1-7.

Desai M, Han G, Ross MG. Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: Altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators. *Appetite.* 2016;99:193-9.

Ferguson D, Shao N, Heller E, Feng J, Neve R, Kim HD, Call T, Magazu S, Shen L, Nestler EJ. SIRT1-FOXO3a regulate cocaine actions in the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2015;35(7):3100-11.

Laureano DP, Dalle Molle R, Alves MB, Luft C, Desai M, Ross MG, Silveira PP. Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet taste in newborn pups - Role of the accumbal μ -opioid receptors. *Neuroscience.* 2016;13; 322:500-8.

Paxinos G, Franklin K. The mice brain in stereotaxic coordinates. 4^a edition, Elsevier, 2013.

Shahrokh DK, Zhang TY, Diorio J, Gratton A, Meaney MJ. Oxytocin-Dopamine Interactions Mediate Variations in Maternal Behavior in the Rat *Endocrinology.* 2010; 151(5):2276–2286.

APÊNDICE B: Imagens referentes aos experimentos realizados nessa Tese

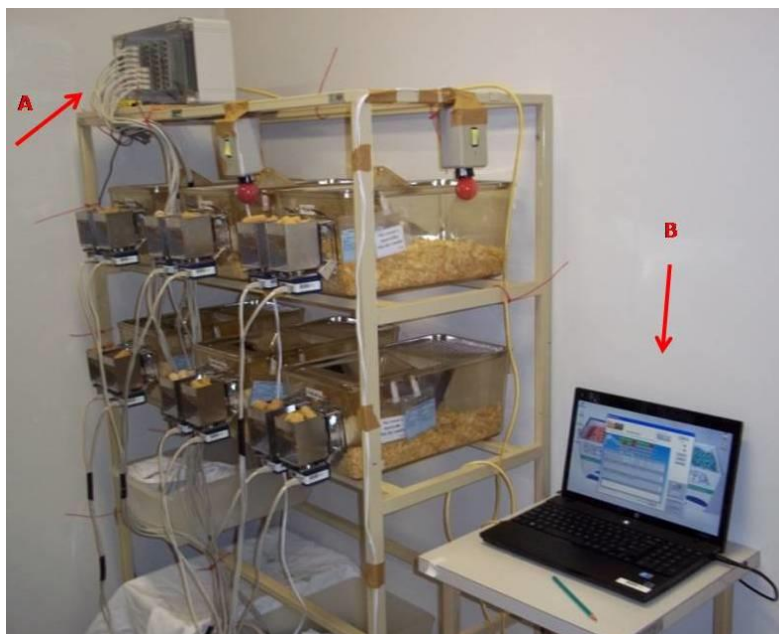


Figura 1: BioDAQ®. Cada caixa em que o animal se encontra está conectada a uma central (A) que envia as informações diretamente ao computador (B).



Figura 2: Vista lateral BioDAQ®.



Figura 3: BioDAQ®. Compartimentos onde são acondicionados os alimentos.



Figura 4: Eletrodo de fibra de carbono utilizado para a realização da cronoamperometria.

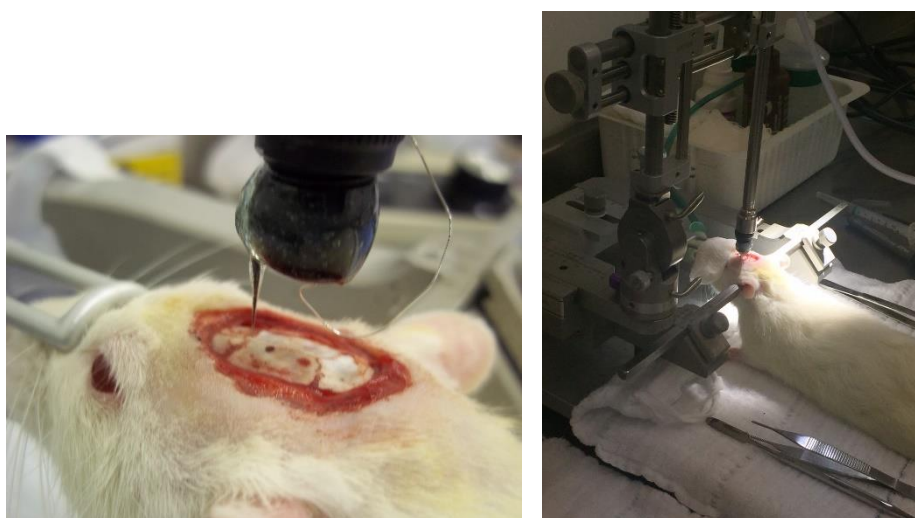


Figura 5: Imagens cirurgia estereotáxica.

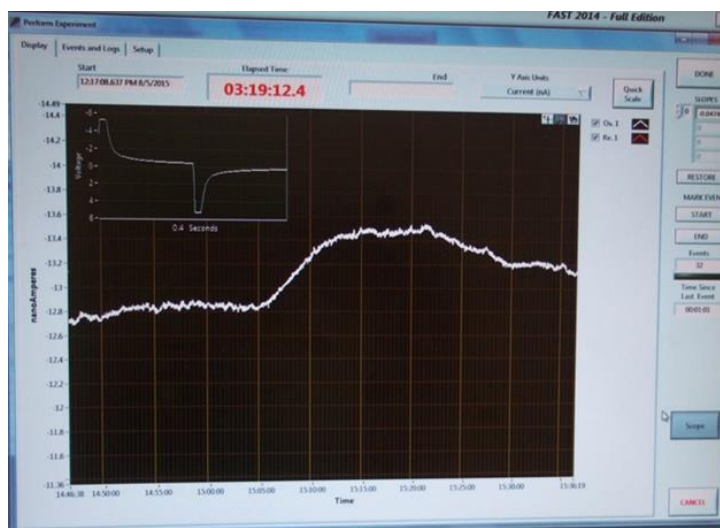


Figura 6: Programa FAST. Imagem captada durante a realização da cronoamperometria.



Figura 7: Imagem captada durante a realização da cronoamperometria. Openfield onde foi realizado o experimento.

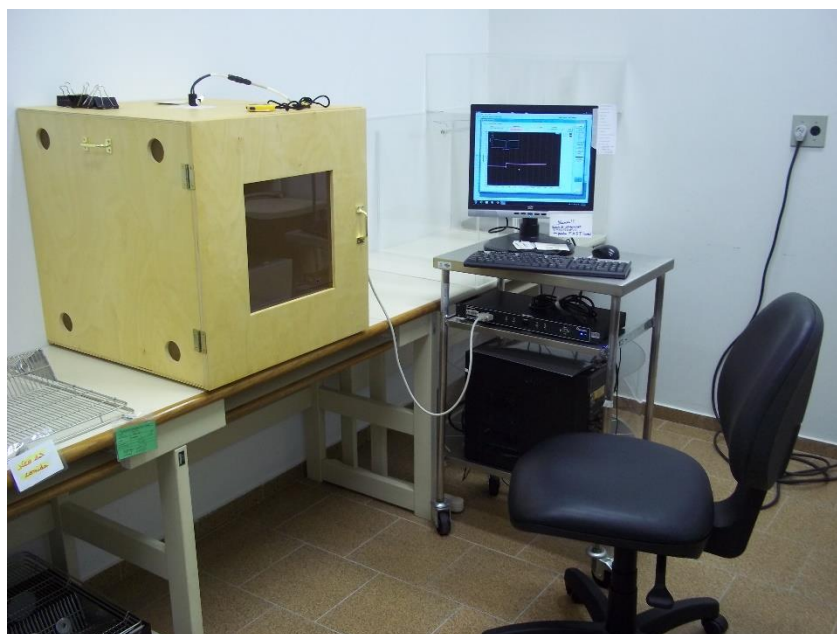


Figura 8: Sala onde foi realizada a cronoamperometria.