

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

Ana Paula Bosquetti dos Santos

**ESTRESSE E DIETA RICA EM GORDURA DURANTE O DESENVOLVIMENTO:
IMPACTO SOBRE A PLASTICIDADE E A NEUROGÊNESE NO HIPOCAMPO DE
RATOS WISTAR**

Porto Alegre

2020

Ana Paula Bosquetti dos Santos

**ESTRESSE E DIETA RICA EM GORDURA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO: IMPACTO SOBRE A PLASTICIDADE E A
NEUROGÊNESE NO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas
da Saúde da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial para a
obtenção do título de mestre(a) em
Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Dalmaz

Coorientadora: Profa. Dra. Rachel Krolow S. S. Bast

Porto Alegre

2020

Dedico esta dissertação
em especial aos meus pais, meus
irmãos, família e a todos
amigos e pessoas especiais que colaboraram nesta caminhada.

Sumário

PARTE I	1
Resumo	2
Abstract.....	3
Lista de abreviaturas	4
1. Introdução.....	5
1.1 A influência de fatores ambientais no desenvolvimento	5
1.2 Isolamento social: Um potente estressor no início da vida.....	6
1.3 Consumo de dieta rica em gordura e suas consequências no sistema nervoso	9
1.4 Adversidades no início da vida: o impacto sobre a memória na idade adulta	11
1.5 A vulnerabilidade do hipocampo e o prejuízo da memória	13
2. Justificativa.....	17
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivo geral:	18
3.2 Objetivos específicos:.....	18
PARTE II	19
4. Materiais e métodos.....	20
4.1 Aspectos éticos e desenho experimental	20
4.2 Testes comportamentais	21
4.3 Obtenção das estruturas para determinações bioquímicas	23
4.4 Estudo da via de sinalização da leptina no hipocampo dorsal.....	23
4.5 Avaliação por Western blot	24
4.6 Imunoistoquímica	25
4.7 Citometria de fluxo	26
4.8 Análise estatística	27
5. Resultados.....	28
5.1 Resultados comportamentais:	30
5.2 Análises bioquímicas:.....	35
Parte III	43
6. Discussão	44
7. Conclusão	54

8. Perspectivas	54
9. Referências	55
10. Lista de figuras	72

PARTE I

Resumo

Uma fase muito importante para o desenvolvimento cerebral é a fase que antecede a puberdade. Durante essa fase, o hipocampo apresenta um aumento na plasticidade e maturação, característica que é diminuída na fase adulta. A exposição a diferentes fatores ambientais durante essa fase, como estresse, e também acesso a diferentes dietas, tem efeitos sobre a maturação cerebral, sendo que esses dois fatores podem estar relacionados à geração de alterações comportamentais e neuroquímicas, que podem ter resultados patológicos na vida adulta. O estresse do tipo isolamento social bem como uma dieta hiperlipídica têm, ambos, efeitos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que estão relacionados às respostas ao estresse no decorrer da vida. Ambos os fatores mencionados têm efeitos que podem ser prejudiciais sobre a plasticidade na região do hipocampo. Contudo, dietas ricas em lipídios podem levar ao aumento do hormônio leptina (que está relacionado à estimulação da plasticidade cerebral). Ainda, a exposição a situações de estresse podem estimular o consumo de dietas ricas em lipídios. A partir disso, este trabalho tem como objetivo estudar como o uso crônico de dieta rica em gordura (DRG) ao longo do desenvolvimento bem como a exposição curta ao estresse podem interagir para programar a longo prazo o comportamento, relacionando efeitos comportamentais com mudanças neuroquímicas (a neurogênese e a sinalização da leptina no hipocampo).

Nossos resultados mostraram que o consumo de DRG no início da vida levou a prejuízos no hipocampo dorsal, com redução da neurogênese e da funcionalidade mitocondrial na idade adulta. Ao mesmo tempo, houve diminuição do desempenho em uma tarefa de memória espacial. Não foram observadas interações com a exposição ao estresse na pré-puberdade nesses parâmetros, contudo, o estresse causou prejuízo em uma tarefa de medo condicionado ao contexto. Observou-se também alterações na cascata de sinalização da leptina, onde a DRG diminui a sinalização pela via AKT e o estresse aumentou a sinalização por essa via. Nossos resultados sugerem o impacto de modificações ambientais precoces sobre funções hipocámpais, mostrando que essa é uma região vulnerável a intervenções durante o desenvolvimento.

Palavras-chave: Isolamento social; leptina; maturação cerebral; adversidade precoce; memória

Abstract

A very important phase for brain development is the period that precedes puberty. During this phase, the hippocampus shows an increase in plasticity and maturation, with this characteristic decreased in adulthood. Exposure to different environmental factors during this period, such as stress, and also access to different diets, has effects on brain maturation, and these two factors may be related to behavioral and neurochemical changes, which can have pathological results in adult life. Both social isolation stress as well as a high fat diet have effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which is related to responses to stress throughout life. Both mentioned factors may impair plasticity in the hippocampus, although diets rich in lipids lead to an increase in the hormone leptin (which is related to the stimulation of brain plasticity), and it must be considered that exposure to stressful situations can stimulate consumption of these diets. This work aims to study how the chronic use of a high-fat diet (HFD) from weaning as well as a short exposure to isolation stress in the prepuberty can interact to program long-term behavior focusing on memory, and relating behavioral effects to neurochemical changes (on neurogenesis and leptin signaling in the hippocampus).

Results showed that consumption of HFD from early life led to impairments in the dorsal hippocampus, with reduced neurogenesis and in mitochondrial functionality in adulthood. Besides, these animals presented decreased performance in a spatial memory task. No interactions with stress were observed. However, stressed animals showed reduced performance in a fear conditioned task. Changes were also observed in the leptin signaling cascade, where HFD decreased signaling via the AKT pathway and stress increased the signaling pathway. Our results suggest the impact of early environmental on hippocampal functions, showing that this region is vulnerable to early interventions during its development.

Keywords: Social isolation; leptin; brain maturation; early adversities; memory

Lista de abreviaturas

ACTH: Corticotropina

AKT: Serina/treonina cinase, cujo nome deriva do fato de ser homóloga a um oncogene viral (v-akt). Também denominada PKB (proteína cinase B).

ATP: Adenosina trifosfato

C: Controle

CD: Controle Dieta

CRH: Hormônio liberador de corticotropina (da sigla em inglês)

DCX: Doblecortina

DRG: Dieta rica em gordura

E: Estresse

ED: Estresse Dieta

ERK: Cinase regulada por sinais extracelulares (da sigla em inglês)

GCs: Glicocorticóides

HCd: Hipocampo dorsal

HCv: Hipocampo ventral

HHA: Hipotálamo-hipófise-adrenal

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno (da sigla em inglês)

NEUN: Proteína nuclear específica de neurônios

PSD-95: Proteína de densidade pós-sináptica de 95 kDa (da sigla em inglês)

SNAP-25: Proteína associada a sinaptossoma de 25 kDa (do inglês)

SOCS3: Supressor de sinalização de citocinas 3 (da sigla em inglês)

STAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (da sigla em inglês)

1. Introdução

1.1 A influência de fatores ambientais no desenvolvimento

Durante o desenvolvimento, o encéfalo passa por processos fundamentais, que incluem a organização de redes neurais, plasticidade, maturação, diferenciação e sinaptogênese (Bâ, 2011). Períodos críticos no desenvolvimento, como o período neonatal, a infância e a adolescência, são fases em que genética e fatores ambientais interagem para estabelecer características funcionais (Crews e Hodge, 2007). Assim, alterações no ambiente durante o desenvolvimento podem afetar a programação encefálica, levando a efeitos duradouros como alterações na memória (McIntosh et al., 2013), na neurogênese (Park et al., 2010), na sinalização hormonal e no metabolismo energético (Toniazzo et al., 2018), de forma a propiciar maior resiliência ou vulnerabilidade aos efeitos do estresse na idade adulta (Paus et al., 2008).

Algumas regiões encefálicas, em função de seu padrão de maturação, são especificamente sensíveis a intervenções nesses períodos do desenvolvimento. O hipocampo apresenta um aumento na plasticidade e na maturação antes da puberdade, que diminui na idade adulta (He e Crews, 2007; Yildirim et al., 2008).

No período pré-púbere, que corresponde do 21º ao 30º dias de vida pós-natal em ratos (Eiland e Romeo, 2013), variações ambientais como experiências adversas e / ou estressantes podem ter efeitos marcantes e negativos de longo prazo sobre o comportamento social, emocional e sobre a cognição, efeitos esses que podem surgir durante a infância e persistir na idade adulta (Arcego et al., 2017). Ainda, a exposição a estressores também afeta a escolha alimentar, onde animais estressados mostram

preferência por alimentos mais palatáveis, como alimentos doces e com alto teor de gordura (Zenk et al, 2013).

Estudos já mostraram que o estresse precoce e uma dieta rica em gordura podem alterar a fisiologia e o desenvolvimento hipocampal e afetar a trajetória da maturação neural nesta estrutura, contribuindo com alterações no comportamento cognitivo e emocional do animal (Arcego et al., 2018; Krolow et al., 2012; Reichelt et al., 2017; Toniazzo et al., 2018). Um trabalho recente do nosso grupo observou que tanto o isolamento social durante períodos precoces (pré-puberdade), quanto o acesso crônico a dietas ricas em gordura levaram a prejuízos na plasticidade cerebral do hipocampo de ratos machos (Arcego et al., 2018). Essas alterações possivelmente afetam a susceptibilidade a psicopatologias na vida adulta (Arcego et al., 2018; Toniazzo, 2018).

1.2 Isolamento social: Um potente estressor no início da vida

Os estressores ocorrem em vários momentos ao longo da vida, com graus variados de cronicidade e gravidade (Keyes et al., 2011). Um estressor é definido como um desafio ao organismo que pode potencialmente perturbar a homeostase e, portanto, requer uma resposta fisiológica (Arcego et al., 2014). A exposição a variadas formas de estresse é uma experiência de vida integral que pode provocar uma variedade de reações (Keyes et al., 2011). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é o principal sistema fisiológico que medeia a resposta ao estresse no organismo. O núcleo paraventricular do hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH) em resposta a sinais interpretados como ameaças por regiões do encéfalo como a amígdala. O CRH atua na hipófise anterior para induzir a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na corrente sanguínea, o qual se liga aos receptores no córtex adrenal para induzir a síntese e liberação de glicocorticoides, como o cortisol, o produto final da ativação do eixo

HHA em humanos, ou a corticosterona (principal glicocorticoide em roedores) (McCormick et al., 2007). Os glicocorticoides têm efeitos generalizados em todo o organismo e atravessam a barreira hematoencefálica para regular a atividade do eixo HHA, atuando nos receptores glicocorticóides (GC) e mineralocorticoides em regiões cerebrais límbicas, como o hipocampo, desencadeando mecanismos de feedback negativo, inibindo assim sua própria produção (Jurueña et al., 2004). Em ratos, durante as fases iniciais da vida, esse eixo funciona de maneira diferente em comparação aos adultos. Em adolescentes, por exemplo, a secreção de corticosterona após a exposição a um estressor agudo é atrasada, mas é mais prolongada quando comparada a ratos adultos (Romeo et al., 2010), e a habituação a estressores é menos eficiente (Krolow et al., 2012).

A perturbação que o estresse causa à homeostase corporal leva a alterações em processos fisiológicos e neuroquímicos no organismo. São muitos os tipos de desafios que podem desencadear uma resposta ao estresse; um exemplo de estressor particularmente importante no período pré-púbere é o estresse por isolamento social (Krolow et al., 2012). É conhecido que o ambiente social é uma fonte de estresse tanto para os seres humanos quanto para os roedores, especialmente durante o período pré-púbere. As espécies sociais, por definição, formam organizações que se estendem além do indivíduo. Estas organizações evoluíram junto com comportamentos e mecanismos neurais, hormonais, celulares e genéticos para apoiá-las, porque os consequentes comportamentos sociais ajudaram esses organismos a sobreviver, reproduzir e cuidar da prole o tempo suficiente para que essa prole também se reproduzisse (Cacioppo et al., 2011). O isolamento social tem sido cada vez mais discutido no campo da saúde mental (Wang et al., 2017). Os efeitos do isolamento social, tanto em humanos, quanto em outras espécies sociáveis são muito parecidos, pois promove ativação do eixo HHA

(Cacioppo et al., 2011). Outros estudos observaram que este tipo de estressor pode aumentar a sensibilidade da hipófise à administração exógena de hormônio liberador de corticotropina (CRH), prejudicar a regulação do feedback negativo do eixo HHA em ratos machos (Serra et al., 2005), aumentar o conteúdo de CRH em machos e modificar significativamente a quantidade de GCs no hipocampo de ratos machos e fêmeas (Pisu et al., 2016).

A exposição ao isolamento social em fases precoces do desenvolvimento pode influenciar processos de maturação cerebral, levando a alterações comportamentais e neuroquímicas que podem persistir até a idade adulta (Arakawa et al., 2005; Arcego et al., 2018; Leussis et al., 2008; McCormick, 2007; Toniazzo et al., 2019). Os efeitos induzidos pelo isolamento social são dependentes do período de isolamento e da idade em que ele ocorre. A maioria dos estudos investiga os efeitos adversos do isolamento social ao longo do desenvolvimento. Os principais achados mostraram prejuízo na memória, no comportamento alimentar e emocional (Okada et al., 2015; Wang et al., 2019; Watt et al., 2017; Zorzo et al., 2019). Também foram observadas alterações em marcadores bioquímicos envolvidos com processos capazes de afetar tais comportamentos, como resistência a glicocorticoides, expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (Xia et al., 2018), redução da atividade neuronal e diminuição da capacidade sináptica no córtex pré-frontal e no hipocampo na idade adulta (Okada et al., 2015; Wang et al., 2019; Zorzo et al., 2019).

O contato social é fundamental para a saúde, principalmente durante o desenvolvimento. A privação social pode, como comentado acima, causar inúmeras alterações na maturação encefálica, podendo diretamente afetar o comportamento do animal. Assim, estudos experimentais utilizando o modelo de isolamento social no

início da vida podem ajudar a compreender os mecanismos neuroquímicos envolvidos que podem desencadear prejuízos comportamentais na idade adulta.

1.3 Consumo de dieta rica em gordura e suas consequências no sistema nervoso

Nos últimos 100 anos, a dieta nos países desenvolvidos registrou um aumento impressionante nas quantidades consumidas de gordura e açúcar per capita. Não surpreendentemente, esses aumentos estão correlacionados com o aumento das taxas de obesidade (Spencer et al., 2017). Um dos fatores para o alto consumo de uma dieta rica em gordura é a presença de estressores. Estudos epidemiológicos e experimentais já demonstraram que em situações de estresse ocorre um aumento no consumo de alimentos altamente calóricos na tentativa de diminuir ou aliviar os efeitos adversos do estresse (Dallman et al., 2005; Izadi et al., 2018; Tomiyama et al., 2012). O aumento do consumo de dietas ricas em gordura pode programar o metabolismo e causar alterações na saúde como o aumento do peso, a hiperglicemia, a hiperinsulinemia, alterações em adipocinas plasmáticas (leptina e adiponectina) e obesidade (Dallman et al., 2003; Toniazzo et al., 2018). Estudos mostraram que uma exposição crônica a uma dieta rica em gordura saturada a partir da adolescência induziu um aumento no peso corporal dos animais adultos, aumentou os níveis plasmáticos de leptina e prejudicou a sua sinalização neuroendócrina (Arcego et al., 2013; Toniazzo et al., 2018). Esse hormônio é secretado pelo tecido adiposo branco e se liga a receptores específicos no núcleo arqueado do hipotálamo, resultando na inibição de neurônios orexígenos e ativando neurônios anorexígenos (Zhang et al., 2005). Além disso, apresenta receptores em várias outras estruturas do encéfalo onde atua em diferentes processos (Guo et al., 2008). Ao ligar-se a seu receptor, ativa a via de sinalização JAK/STAT3, que ativa a

transcrição, entre outros, do gene supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3). O aumento da expressão de SOCS3 gera uma retroalimentação negativa e atenua a sinalização de leptina-JAK/STAT3 (Ladyman et al., 2013; Toniazzo et al., 2018). No entanto, o consumo de dieta rica em gordura desencadeia resistência central e periférica à leptina (Knight et al., 2010; Toniazzo et al., 2018) e, conseqüentemente, interrompe a sinalização JAK/STAT3. A resistência central aos efeitos da leptina no hipocampo pode prejudicar a função sináptica induzindo prejuízo de aprendizado e da memória (McGregor e Harvey, 2018; Van Doorn, 2013; Zou et al., 2019).

A maturação encefálica ao longo do desenvolvimento pode sofrer modificações induzidas pelo consumo de uma dieta altamente calórica (Arcego et al., 2018; Reichelt et al., 2017). O hipocampo é extremamente vulnerável aos efeitos do consumo de gordura saturada. Essa vulnerabilidade pode estar diretamente associada a alterações comportamentais na idade adulta. Estudos mostraram que o consumo crônico de DRG induziu alterações cognitivas e emocionais nos animais (Arcego et al., 2018; Beilharz et al., 2015; Cavaliere et al., 2019). Alterações na plasticidade sináptica e na neurogênese foram observadas no hipocampo pelo consumo excessivo de uma dieta rica em gordura saturada (Han et al., 2019; Park et al., 2010). Arcego e colaboradores (2018) mostraram que o consumo crônico de uma dieta contendo 42% de gordura reduziu marcadores relacionados a funções neuronais no hipocampo, tais como β III-tubulina, PSD-95, SNAP-25 e neurotrofina-3. Park e colaboradores (2010) verificaram que uma dieta contendo 45% de gordura saturada durante a idade adulta induziu um prejuízo na neurogênese e uma redução na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, da sigla em inglês *brain derived neurotrophic factor*) no hipocampo de camundongos.

Baseado nos estudos relatados, o consumo crônico de DRG pode programar o metabolismo periférico e central e prejudicar a plasticidade do sistema nervoso. O hipocampo, em particular, é extremamente vulnerável aos efeitos deste tipo de dieta podendo aumentar a susceptibilidade a prejuízos cognitivos como o aprendizado e a memória.

1.4 Adversidades no início da vida: o impacto sobre a memória na idade adulta

A memória pode ser definida como o registro da representação de informações adquiridas por meio de experiências. Experiências adversas no início da vida, como a exposição ao estresse e o consumo de DRG, podem, ao alterar a maturação encefálica, afetar funções cognitivas e prejudicar a memória na vida adulta (Arcego et al., 2016; Granholm et al., 2008; McIntosh et al., 2013; Quan et al., 2010; Valladolid-Acebes et al., 2011; Watson et al., 2012). Em modelos animais, o isolamento social a curto e a longo-prazo levou a déficit cognitivo, com prejuízo na memória de reconhecimento de objetos (Arcego et al., 2016; Gaskin et al., 2014; Jones et al., 2011; McIntosh et al., 2013; Watson et al., 2012). A tarefa de reconhecimento de objetos requer uma série de funções cognitivas como percepção, discriminação, identificação e comparações (Warburton and Brown, 2015). Por ser uma tarefa baseada na natural tendência dos roedores em explorar novos ambientes e/ou objetos, ela não exige um alto grau de emocionalidade do animal. Arcego e colaboradores (2016) verificaram que os animais submetidos ao isolamento social durante o período pré-púbere (21-28 pós-natal) mostraram um prejuízo na memória de curto-prazo para reconhecimento de objetos na idade adulta. No entanto, a maioria dos estudos verificou os efeitos do isolamento social a longo-prazo sobre a memória: o isolamento social desde o desmame (21 dias pós-

natal) até a idade adulta (60 a 70 dias) também levou a prejuízo na memória de reconhecimento de objetos (Gaskin et al., 2014; Jones et al., 2011; McIntosh et al., 2013; Watson et al., 2012). Assim, os animais submetidos à privação do contato social, em períodos curtos no início da vida e em períodos crônicos ao longo do desenvolvimento, apresentaram prejuízo da memória de reconhecimento de objetos na idade adulta.

A memória aversiva também foi prejudicada pelo isolamento social quando este protocolo foi aplicado desde o dia do desmame (PN 21) até a idade adulta (PN 60) ou aplicado por 4 semanas na idade adulta (Liu et al., 2015; Okada et al., 2015). A tarefa de medo condicionado é utilizada para avaliar memórias aversivas, resultantes de uma situação de perigo, e está associada a processos de reações e adaptações frente a situações de risco (Couto-Pereira et al., 2019; Diehl et al., 2014). A tarefa envolve um alto grau de emoção, pois o animal é exposto a um contexto aversivo com um breve choque nas patas. Após 24 horas os animais são expostos novamente ao mesmo contexto e respondem com um comportamento defensivo, denominado congelamento (*freezing*) e caracterizado por ausência de movimentos, que é considerado uma medida da memória para a tarefa. Os estudos mostraram que animais submetidos ao isolamento social crônico apresentaram aumento do tempo de *freezing* (Liu et al., 2015).

A DRG também pode prejudicar a memória (Haleem e Mahmood, 2019; Kaczmarczyk et al, 2013, Khazen et al, 2019; Spencer et al., 2017). Muitos estudos utilizam protocolos que diferem no tempo de exposição, na quantidade e no tipo de gordura oferecida para o animal. Alguns trabalhos que utilizaram dieta rica em gordura saturada a curto ou a longo-prazo mostraram que os animais apresentaram um prejuízo na memória dependente de hipocampo. Um consumo a curto-prazo prejudicou a memória de medo condicionado ao contexto de longo prazo (dependente do hipocampo) e de medo condicionado a um estímulo auditivo (dependente da amígdala) em ratos

adultos (Spencer et al., 2017). Outro estudo mostrou que a exposição também de curto prazo à DRG durante a adolescência reduziu a plasticidade sináptica do hipocampo e a memória dependente do hipocampo a longo prazo, no teste de memória de reconhecimento de objeto realocado. Ainda, camundongos expostos a um período de uma semana de DRG mostraram prejuízo na memória de reconhecimento de objetos (Kaczmarczyk et al., 2013). Camundongos que consumiram DRG por três dias apresentaram maior vulnerabilidade a falhas de memória causadas por um desafio imunológico de baixa dose (10 µg / kg) de lipopolissacarídeo (LPS) no hipocampo (Sobesky et al., 2016). Outros estudos também observaram prejuízos em memórias dependentes de hipocampo, como o reconhecimento de objetos, depois de uma semana de exposição a DRG, e prejuízos na memória de localização de objetos, após 3 semanas de DRG em camundongos (Gainey et al., 2016). Outro estudo, contudo, não observou efeito da DRG em curto prazo (Khazen et al., 2019).

A memória dependente do hipocampo é extremamente vulnerável aos efeitos do isolamento social e do consumo de DRG. A maioria dos protocolos experimentais utilizaram o isolamento social de forma crônica e ofereceram DRG para os animais durante o desenvolvimento. No entanto, seria importante investigar como a influência do isolamento no período pré-púbere poderia impactar a memória na idade adulta, uma vez que o hipocampo, durante as fases iniciais da vida, está em constante processo de maturação, e se há interação entre esses fatores ambientais no que se refere a seus efeitos sobre a memória.

1.5 A vulnerabilidade do hipocampo e o prejuízo da memória

O hipocampo é parte do sistema límbico e, em humanos, está localizado no lobo temporal. É constituída pelo *Cornu Ammonis* 1–4 (CA1–4) e giro denteado (Tatu e

Vuillier, 2014). Além disso, não é uma estrutura homogênea em termos de circuitos: ele pode ser dividido em regiões ventral e dorsal. O hipocampo ventral relaciona-se com regiões envolvidas com emoção e estresse (amígdala e hipotálamo). Já o hipocampo dorsal se relaciona com regiões corticais envolvidas no processamento de informações. O hipocampo dorsal funciona como um organizador para as memórias declarativas (Fanselow e Dong, 2010).

Durante certas fases do desenvolvimento, processos como neurogênese, crescimento dendrítico e axonal e poda sináptica ocorrem intensamente no hipocampo (Crews et al., 2007; Weitzdörfer et al., 2008). Em particular, a neurogênese no giro denteado continua na idade adulta (Kempermann et al., 2004) e inicia com a proliferação de células progenitoras, passa para o processo de migração e subsequentemente atinge a diferenciação em neurônios funcionais que interagem com a rede neural do hipocampo já existente (Kempermann et al., 2004). O contínuo surgimento de novos neurônios é importante para a formação de sinapses funcionais (Praag et al., 2002; Kempermann et al., 2004). Todos esses processos fazem parte da plasticidade neural e são fundamentais para o papel central do hipocampo, incluindo o aprendizado e a consolidação de novas memórias (Cameron e Christie, 2007; Deng et al., 2010; Winocur et al., 2006; Woźtowicz et al., 2008).

A exposição a diferentes tipos de estresse e o consumo de dietas altamente calóricas podem reduzir a neurogênese e prejudicar o desempenho de tarefas que avaliam o aprendizado e a memória dependente de hipocampo (Lajud et al., 2012; Park et al., 2010; Ruiz et al., 2018; Suri et al., 2014). É interessante que, quando o estresse é aplicado na idade adulta do animal, a neurogênese é reduzida, mas o uso de certos fármacos, como o tratamento com mifepristona (antagonista do receptor de glicocorticóide), reverte esse efeito (Oomen et al., 2007). Já se o estresse ocorre no início da vida, alguns estudos verificaram que o prejuízo da neurogênese na idade adulta não é revertido (Lemaire et al., 2000). Marcadores sinápticos também foram reduzidos pela influência do estresse por isolamento social, com diferentes protocolos, e o consumo de dieta rica em gordura saturada no hipocampo dos animais (Arcego et al., 2018; Cheng et al., 2019; Ieraci et al., 2016).

Outros processos moleculares como a funcionalidade mitocondrial e a sinalização hormonal no hipocampo também são importantes para o aprendizado e a memória (Arrázola et al., 2019; Yook et al., 2019). Vários processos que ocorrem no hipocampo requerem energia para homeostase celular. A maior parte dessa energia, proveniente da molécula de adenosina trifosfato (ATP), é fornecida pelas mitocôndrias. Uma redução na funcionalidade mitocondrial pode comprometer processos como a manutenção do potencial de membrana, a transmissão sináptica, a formação de espinhos dendríticos, a poda sináptica e o processo de diferenciação neuronal no hipocampo (Flippo e Strack, 2017; Vos et al., 2010). Krolow e colaboradores (2013) verificaram que o isolamento social durante o período pré-púbere alterou a função mitocondrial no hipocampo de ratos jovens. Assim, um prejuízo na atividade neuronal relacionada à produção de energia e na plasticidade podem ser responsáveis pelo prejuízo da memória dependente de hipocampo.

O hormônio leptina tem ação direta no hipocampo. Isso é devido à presença de receptores para leptina nessa região encefálica. Vários estudos mostraram que a ativação dos receptores de leptina no hipocampo promove plasticidade sináptica e a cognição. As vias de sinalização da leptina, STAT-3 e SOCS3, também regulam a plasticidade de forma indireta, pois estimulam a transcrição de genes envolvidos com a produção de citocinas, crescimento de neuritos e estresse oxidativo mitocondrial (Guo et al., 2008; Miao et al., 2006; Yang et al., 2007). Sendo assim, a sinalização mediada pela leptina tem forte impacto na plasticidade do hipocampo e pode ser um processo bioquímico importante para o aprendizado e a memória. Por exemplo, estudos verificaram que injeções de leptina no hipocampo, impactaram positivamente e de modo dose-dependente o aprendizado e a memória (Far et al., 2006; Paulus et al., 2005). Além disso, a administração periférica de leptina aumentou o desempenho dos animais na tarefa do labirinto aquático de *Morris* (Haleem et al., 2015). No entanto, a resistência aos efeitos mediados pela sinalização da leptina levou a um prejuízo na cognição e na memória. Manipulações experimentais que induzem resistência à leptina, como o uso de dieta rica em gordura saturada, apresentam efeitos deletérios para a estrutura e a função do hipocampo induzindo prejuízo na memória (Hosseini et al., 2014; Kanoski et al., 2007; Kanoski e Davidson, 2010).

Coletivamente, esses achados mostraram que a neurogênese, a plasticidade, a função mitocondrial e a sinalização hormonal pela leptina no hipocampo são extremamente conectadas e vulneráveis aos efeitos do ambiente, e que alterações nesses processos podem estar diretamente associadas com o prejuízo na memória. Neste trabalho, hipotetizamos que fatores como estresse por isolamento na pré-puberdade e dieta rica em gordura poderiam apresentar uma interação em seus efeitos sobre a memória e sobre a função hipocampal. Em função da alta exposição a dietas de alto conteúdo calórico e

ricas em gorduras na sociedade ocidental desde a infância e da ocorrência de estresse na infância (bullying, maus tratos, trabalho infantil, excesso de compromissos) o estudo da possível interação entre esses fatores ambientais no que se refere a seus efeitos cognitivos e os possíveis mecanismos subjacentes é de grande relevância para orientar políticas de saúde pública.

2. Justificativa

Fatores ambientais precoces, como a exposição a estressores e dieta rica em gordura, têm efeitos de longo prazo sobre o sistema nervoso central, afetando a vulnerabilidade a declínios cognitivos e desenvolvimento de psicopatologias posteriormente na vida. A obesidade é um grande problema de saúde pública, e o consumo de alimentos ricos em gordura está relacionado ao acúmulo de gordura e à produção de hormônios relacionados ao controle do balanço energético, especialmente leptina (Hariri e Thibault, 2010). Tendo em vista ainda que os fatores mencionados alteram a maturação cerebral no início da vida (Lapiz et al., 2003), é importante estudar esse impacto a longo prazo.

Ainda, a exposição ao estresse combinada ao acesso a dieta altamente calórica pode ser uma das razões da alarmante prevalência de obesidade e sobrepeso em crianças e adolescentes (Ogden et al., 2012). Uma das consequências da exposição ao estresse é a mudança na ingestão de alimentos, tanto no que se refere a quantidade e a qualidade. Tem sido sugerido que alimentos altamente calóricos (alimentos “confortantes”, ricos em gordura e/ou açúcares) atuam como um meio de reduzir a resposta ao estresse (Adam e Epel, 2007). Nesse sentido, torna-se importante estudar a associação entre o ambiente estressante e o acesso a dietas hipercalóricas no início da vida.

Pretende-se, com este estudo, possibilitar um melhor conhecimento sobre os efeitos da utilização de dieta rica em gordura e da exposição ao estresse social em crianças e adolescentes, e fornecer assim subsídios para políticas de saúde pública.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho de dissertação é estudar como o uso crônico de uma dieta rica em gordura (DRG) ao longo do desenvolvimento, bem como a exposição curta ao estresse na pré-puberdade, podem interagir para programar a longo prazo o comportamento. Avaliaremos possíveis efeitos sobre a memória, relacionando efeitos comportamentais com mudanças neuroquímicas, particularmente neurogênese, função mitocondrial e resposta à leptina no hipocampo.

3.2 Objetivos específicos:

Neste trabalho de Dissertação, temos por objetivos específicos verificar os efeitos da exposição ao estresse por isolamento social na pré-puberdade e do uso crônico de DRG sobre:

1. a memória em distintas tarefas comportamentais, utilizando tarefas envolvendo memória aversiva e memória espacial;
2. a atividade motora e a ansiedade;
3. a neurogênese e a função mitocondrial no hipocampo dorsal;
4. a sinalização da leptina (STAT3, AKT, ERK) no hipocampo.

Utilizaremos hipocampo por ser uma estrutura especialmente envolvida na memória e suscetível a mudanças ambientais nessas fases do desenvolvimento. Como as porções dorsal e ventral apresentam diferentes conexões e parecem estar envolvidas em funções distintas, avaliaremos, de acordo com a técnica empregada, hipocampo total ou dorsal separadamente, por este último estar particularmente envolvido na memória de contexto (Fanselow e Dong, 2010).

PARTE II

4. Materiais e métodos

4.1 Aspectos éticos e desenho experimental

Os procedimentos propostos por esse projeto são de uso habitual por autores que trabalham e publicam na área. Obedeceram às normas propostas pelo “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996) e a Lei AROUCA n° 11.794 de outubro de 2008. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS; projeto 35334, aprovado em 02/10/2018).

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em caixas confeccionadas em plexiglas com assoalho recoberto de maravalha autoclavada e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h (luz das 6h às 18h), com água e alimento *ad libitum* e uma temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados 128 ratos com 21 dias.

No dia pós-natal (PND) 21, ratos Wistar foram desmamados e apenas filhotes machos foram utilizados. Metade dos animais foi alojada em grupos de quatro ou três por gaiola, a outra metade foi submetida ao estresse por isolamento social (um único animal em uma gaiola doméstica menor, $27 \times 17 \times 12$ cm). O estresse por isolamento foi aplicado durante 1 semana, entre os PNDs 21 e 28. No PND 28, os animais isolados foram devolvidos às gaiolas regulares ($65 \times 25 \times 15$ cm) em grupos de três ou quatro. Cada grupo (controle ou estressado), a partir do PND 21, foi subdividido em dois outros grupos, de acordo com a dieta: (1) recebendo ração padrão (50% de carboidrato, 22% de proteína e 4% de gordura) ou (2) recebendo ração padrão e DRG *ad libitum* (25 % de

carboidratos, 28% de proteína e 42% de gordura). Assim, foram formados os grupos:

(1) Controle com ração padrão (C, n=32), (2) Controle com ração padrão + dieta hiperlipídica (CD, n=32), (3) Estresse com ração padrão (E, n=32), (4) Estresse com ração padrão + dieta hiperlipídica (ED, n=32). Quantidades iguais de ração padrão e DRG foram oferecidas aos animais. Essa dieta foi pesada assim como, posteriormente, os pellets não consumidos. O consumo de alimentos foi medido durante todo período por gaiola, três vezes por semana, e a quantidade de alimentos consumida foi dividida pelo número de animais por gaiola para determinar o consumo médio. Para verificar o consumo em quilocalorias, a quantidade de alimento ingerido foi multiplicada pelo conteúdo calórico por grama de DRG (conteúdo calórico: ração padrão, 3,24 kcal /g; DRG, 5,8 kcal/g). Segue abaixo a linha do tempo experimental.



4.2 Testes comportamentais

A partir dos 60 dias de vida, foram iniciados os testes comportamentais, avaliando-se atividade exploratória, memória de reconhecimento de objetos, memória de medo e comportamento do tipo ansioso.

O teste de campo aberto consistiu em uma arena aberta com paredes (50 x 50

cm, altura 50 cm). Toda a arena de teste foi ajustada com iluminação uniforme. Os ratos foram colocados no centro da arena, e sua atividade foi registrada por 10 minutos, durante três dias consecutivos, no turno da manhã. A distância total percorrida foi utilizada como medida da atividade motora geral, com um *software* (ANY Maze(R)) que, por meio de uma câmera, avalia a mobilidade do animal. Este teste teve a finalidade de avaliar a atividade exploratória dos animais (Guo et al., 2013).

O teste de localização de objetos com um objeto realocado teve como finalidade avaliar a memória espacial dos animais. Este procedimento foi realizado 24h após a exposição ao campo aberto, descrita acima, e ocorreu de forma que inicialmente os animais foram expostos a dois objetos iguais em uma arena de campo aberto (50 x 50 cm, altura 50 cm), por 5 minutos. Após intervalo de 90 minutos (curta-duração), os animais foram reexpostos por 5 minutos ao mesmo aparato com um dos objetos deslocado para o canto da caixa (Broadbent et al., 2010). O teste consistiu em um único dia e ocorreu no turno da manhã, em salas específicas para testes comportamentais, com luminosidade controlada.

O teste claro/escuro teve como finalidade avaliar o comportamento do tipo ansioso nos diferentes grupos, e ocorreu em caixa plástica com dois compartimentos, um escuro (36 x 20 x 40 cm) e um claro (44 x 20 x 40 cm), conectados por uma porta (7 x 10 cm) no meio da parede separando-os. Os dois compartimentos eram conectados por uma pequena abertura. Os ratos eram colocados na metade clara da caixa. Os animais foram expostos à caixa durante 5 minutos. As análises foram realizadas contabilizando o tempo de exploração em cada lado da caixa, claro ou escuro. Animais com comportamento do tipo ansioso tendem a passar mais tempo no lado escuro. A latência para emergir no compartimento escuro foi determinada assim como a primeira entrada no compartimento claro. As seguintes medidas comportamentais foram registradas: tempo no compartimento claro, número de entradas no compartimento

claro, número de explorações no compartimento claro (*rearings*) e número de SAPs (*Stretched Attend Posture*) (Arrant et al, 2013).

O teste de medo condicionado ao contexto avaliou a memória de medo nos animais e consistiu em duas sessões, uma de treino e, 24 horas depois, uma de teste. Foi realizada uma ambientação dos animais por 3 horas na sala em que se realizaria o teste comportamental. Para a sessão de aquisição (treino), 24 horas depois da ambientação, os animais foram colocados no aparato de medo condicionado ao contexto, que consiste em uma caixa de madeira (28 x 26 x 23 cm) com barras metálicas na base, por onde passa uma corrente elétrica. Após 3 minutos de ambientação na caixa, os animais receberam 3 choques de 0,7 mA, com duração de 2 segundos, e 30 segundos de intervalo entre os choques (sessão de aquisição). Vinte e quatro horas após a sessão de aquisição, os animais foram colocados novamente no aparato durante 5 minutos, mas não receberam qualquer choque (sessão de teste) (Couto-Pereira et al, 2019).

4.3 Obtenção das estruturas para determinações bioquímicas

A eutanásia por decapitação ocorreu no laboratório, sendo que cada animal foi individualmente levado para uma sala, separado dos demais e morto por um pesquisador devidamente treinado usando guilhotina. O encéfalo foi rapidamente retirado e dissecado em placa sobre gelo, sendo obtido o hipocampo dorsal, conforme o atlas do cérebro de ratos Paxinos e Watson (1998). Para a técnica de citometria de fluxo, as amostras foram imediatamente usadas (a fresco), enquanto para a técnica de western blot as amostras foram rapidamente congeladas e armazenadas a -80 °C.

4.4 Estudo da via de sinalização da leptina no hipocampo dorsal

Considerando que a dieta rica em gordura parece afetar os níveis da leptina no

sangue (Arcego et al.,2014), foi avaliada a resposta à leptina em culturas organotípicas para os quatro grupos estudados, medindo-se a ativação de suas vias de sinalização, tais como as respostas relacionadas às proteínas: STAT3, AKT e ERK/MAPK (inibidor da STAT3) no hipocampo total de ratos machos. Foram preparadas culturas organotípicas de fatias hipocampais (8 animais por grupo) de acordo com o método de Stoppini e colaboradores (1991), com algumas modificações (Valentim et al., 2003). Para isso, foram utilizadas fatias de hipocampo com 400 µm de espessura e colocadas em uma solução salina equilibrada de Hank (HBSS), composta por 6mM glicose, 1,26 mM CaCl₂, 5,36 mM KCl, 136,89 mM NaCl, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,34 mM Na₂HPO₄, 0,49 mM MgCl₂, 0,44 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1% fungizona e 0,01% gentamicina, pH 7,2. As fatias foram colocadas em membranas de cultura Millicell e as inserções transferidas para uma placa de cultura de 6 poços. Cada poço continha 1mL de meio de cultura para tecido, constituído por 50% do meio mínimo essencial (MEM), 25% de HBSS e 25% de soro de cavalo inativado suplementado com 36mM de glicose, 25mM de HEPES, 4% de NaHCO₃, 1% de fungizona e 0,01% de gentamicina em pH 7,3. As culturas foram mantidas em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂/95% de atmosfera de O₂ a 37°C. As culturas foram incubadas com leptina (5µg/mL) ou veículo por 30 minutos e então processadas para determinação das proteínas: STAT3-fosforilada, AKT-fosforilada e ERK/MAPK-fosforilada, pela técnica de Western blot.

4.5 Avaliação por Western blot

Para a realização das análises, as amostras (8 animais por grupo) foram homogeneizadas em tampão de lise (4% SDS, 2,1 mM EDTA, 50 mM Tris) e foram retiradas alíquotas para a dosagem de proteínas. Após, β-mercaptoetanol foi adicionado em uma concentração final de 5%. Amostras contendo 40 µg de proteínas foram

separadas em gel de poliacrilamida 4-12% (SDS - PAGE). Essas proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o aparato de transferência semi-seco (Bio-RadTrans-Blot SD). Após 1h de incubação a 4°C em solução bloqueadora com leite em pó 5% e 0,1% Tween-20 em Tampão Tris-Salino as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com anticorpo primário diluído na mesma solução bloqueadora. Foram utilizados anticorpos contra pSTAT3 (anti-phospho-Stat3, 1:1000, #9145, CellSignaling Technology/USA), STAT3 (anti-Stat3, 1:1000, #9132, CellSignaling Technology/USA), AKT (anti-Akt, 1:1000, #4685, CellSignaling Technology/USA)pAKT (anti-phospho-Akt, 1:1000, #4060, CellSignaling Technology/USA), ERK1/2 (anti-MAPK 1/2, 1:1000, #ABS44, Millipore/USA) e pERK (anti-phospho-p44/p42 MAPK, #9101, CellSignaling Technology/USA)e tubulina (anti-tubulina, 1:2000, #6074, Sigma-Aldrich/USA). Subsequentemente, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, na concentração de 1:1000, por 2 horas em temperatura ambiente, os quais reconhecem como antígenos os anticorpos primários. A imunorreatividade das bandas foi revelada por um kit amplificador de quimioluminescência (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare Life Sciences) e detectada utilizando um fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences). As imagens de *imunoblot* foram analisadas com o *software* StudioLite, e os resultados foram expressos pela razão da intensidade da proteína de interesse pela tubulina na mesma membrana .

4.6 Imunoistoquímica

Os animais (6 animais por grupo) foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental monossódico 100mg/kg com adição de anestésico local, lidocaína 10mg/kg

(conforme as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, 2013) e perfundidos por via transcardíaca rapidamente com solução salina e, a seguir, com paraformaldeído (PFA) a 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH7,4; PBS). Os encéfalos foram retirados e armazenados na mesma solução. Posteriormente, os encéfalos foram crioprotetidos em solução de sacarose a 30% diluída em tampão fosfato e fatiados coronalmente em um criostato em fatias de 30 μm de espessura. As fatias contendo hipocampo foram fixadas em PFA 4%, lavadas com tampão fosfato salino (PBS), permeabilizadas com triton 0,4% por 10 minutos, e após, bloqueadas por 30 minutos com soro de cabra 5% (Sigma-Aldrich) em PBS com 0,4% triton em temperatura ambiente. A seguir, as fatias foram incubadas por 16 horas com o anticorpo primário anti-doblecortina (DCX, 1:100) e anticorpo primário anti-NeuN (NeuN 1:200) a 4°C com soro de cabra 5% em PBS com 0,4% de triton. Após a incubação, as fatias foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente específico (1:300, anti-camundongo ou anti-coelho, conforme o anticorpo primário utilizado) por 1 h em temperatura ambiente em uma câmara escura. Posteriormente, as fatias foram lavadas com PBS, sendo adicionado o meio de montagem fluoromounting (Sigma-Aldrich). As lâminas foram cobertas com uma lamínula e seladas após a secagem. As fatias foram analisadas utilizando um microscópio invertido de fluorescência (Olympus FV1000), com filtros para GFP e MCherry. Três áreas aleatórias por região de interesse (300 μm^2 , giro denteado do hipocampo) foram escolhidas por animal e a fluorescência quantificada utilizando o programa Cell M (Olympus).

4.7 Citometria de fluxo

A avaliação do potencial ($\Delta\Psi$) e da massa mitocondrial foi realizada por meio da utilização de MitoTracker Red (MTR ou Clorometil-X-rosamina) e MitoTracker Green

(MTG) (Pendergrass *et al.*, 2004; Khanal *et al.*, 2011). O hipocampo dorsal dissecado foi dissociado mecanicamente com tampão PBS contendo colagenase em uma concentração necessária para que se obtivesse uma suspensão de células que contenha uma densidade de 200 células/mL. O conteúdo dissociado foi filtrado em filtros de nylon de 40µm (CellFilterStrainer — BD Biosciences) e mantidos no gelo até a coloração mitocondrial. O MTG e o MTR foram dissolvidos em DMSO em uma solução estoque com concentração de 1 mM. Após coradas as células suspensas foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickinson, San Jose, CA). As moléculas foram excitadas a 488 nm usando um laser de argônio. Os controles negativos (amostras sem nenhum fluoróforo) ou controles contendo cada um dos fluoróforos individualmente foram usados para calibragem do aparelho. A emissão dos fluorocromos foi registrada através de filtros específicos: vermelho (FL-3; 670 nm) e verde (FL-1; 530 nm/30) e coletados por amplificação logarítmica. Foram adquiridos os eventos (células intactas) pela média da intensidade da fluorescência que foi determinada após a exclusão de artefatos. As aquisições feitas foram analisadas pelo *CELLQuest Pro data acquisition* (BD Biosciences) e pelo software *FlowJo*.

4.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média e foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (dieta e estresse) ou medidas repetidas.

O nível de significância foi aceito como diferente quando o valor de P foi menor que 0,05.

Parte III

7. Conclusão

Os resultados encontrados demonstram que intervenções precoces durante o desenvolvimento do animal podem afetar processos encefálicos fundamentais. Foi possível observar que o hipocampo dorsal é vulnerável a alterações precoces que fatores ambientais podem causar, sendo que as consequências dessas modificações podem ser muito duradouras, podendo ser vistas na idade adulta dos animais. Os tratamentos afetaram processos fundamentais para a formação de memórias. O consumo de DRG no início da vida levou a prejuízos no hipocampo dorsal, com relação a formação de memória espacial, a neurogênese e à função mitocondrial dessa região na idade adulta. Ainda, foi possível observar alterações na cascata de sinalização da leptina, que foi modificada por ambas intervenções, com a DRG diminuindo a sinalização da leptina via AKT.

Uma vez que a exposição precoce a fatores ambientais é inevitável, torna-se importante estudar o quanto e como determinados tipos de fatores podem trazer consequências a longo prazo.

8. Perspectivas

Diante de nossos resultados mostrando os efeitos em machos, torna-se fundamental um estudo de todos os parâmetros analisados em fêmeas também. É importante uma futura avaliação de todas as medidas bioquímicas realizadas no hipocampo dorsal, no hipocampo ventral. Ainda, como foram encontrados resultados referentes à função mitocondrial, é de interesse também realizar análises de proteínas envolvidas com o

metabolismo energético, como AMPK, pAMPK, Sirt-1 e PGC-1a. Marcadores de inflamação também seriam relevantes, assim como um estudo sobre a microbiota intestinal, a respeito do eixo intestino-cérebro, já que estudos relacionam o consumo de DRG no início da vida e programação hipocampal com alterações na microbiota intestinal (Yang et al, 2019).

9. Referências

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

Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Toniazzo AP, Berlitz C, Lazzaretti C, Schmitz F, Rodrigues AF et al. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: interplay of these factors changes these effects. *Int. J. DevlNeuroscience* 50 (2016) 16–25.

Arcego, DM., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Ferreira, AG., Scherer, E., Wyse, AT., Dalmaz, C. (2014). Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *PhysiolBehav*, 30,23-32.

Arcego DM, Toniazzo AP, Krolow R, et al. Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. *Mol Neurobiol*. 2018;55(4):2740-2753. doi:10.1007/s12035-017-0538-y.

Arrant AE. et al., Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behavioural Brain Research* 256 (2013) 119–127.

Arrázola MS., Andraini T., Szelechowski M., Mouledous L., Arnauné-Pelloquin L., Davezac N., Belenguer P., Rampon C., Miquel MC. ⁵ Mitochondria in Developmental and Adult Neurogenesis *Neurotox Res* . 2019 Aug;36(2):257-267.

Bâ A. Comparative effects of alcohol and thiamine deficiency on the developing central nervous system. *Behavioural Brain Research*. Volume 225, Issue 1, 20 November 2011, Pages 235-242

Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Diet-Induced Cognitive Deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions. *Nutrients*. 2015;7(8):6719-6738. Published 2015 Aug 12. doi:10.3390/nu7085307

Boitard C, Etchamendy N, Sauvant J, et al. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*. 2012;22(11):2095-2100. doi:10.1002/hipo.22032

Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 17:5–11, 2010.

Cacioppo JT, Hawkley LC, Norman GJ, Berntson GG. Social isolation. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1231(1):17-22. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06028.x

Cameron HA, Christie BR. Do new neurons have a functional role in the adult hippocampus? *Dev Neurosci* 2007;1:26–32.

Carey AN, Gildawie KR, Rovnak A, Thangthaeng N, Fisher DR, Shukitt-Hale B. Blueberry supplementation attenuates microglia activation and increases neuroplasticity in mice consuming a high-fat diet. *NutrNeurosci*. 2019;22(4):253–263.

Cavaliere G., Trinchese G., Penna E., Cimmino F., Pirozzi C., Lama A., Annunziata C., Catapano A., Raso G.M, Meli R., Monda M., Messina G., Zammit C., Crispino M., Mollica M.P. High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction *Front Cell Neurosci* 2019 Nov 12;13:509.

Cheng W. , Han F , Shi Y. Neonatal Isolation Modulates Glucocorticoid-Receptor Function and Synaptic Plasticity of Hippocampal and Amygdala Neurons in a Rat Model of Single Prolonged Stress *J Affect Disord* 2019 Mar 1;246:682-694.

Couto-Pereira NS, Lampert C, Vieira ADS, et al. Resilience and Vulnerability to Trauma: Early Life Interventions Modulate Aversive Memory Reconsolidation in the Dorsal Hippocampus. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:134. Published 2019 May 28. doi:10.3389/fnmol.2019.00134

Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *PharmacolBiochemBehav*. 2007;86(2):189-199. doi:10.1016/j.pbb.2006.12.001

Dallman MF. et al. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain, Behavior, and Immunity* 19 (2005) 275–280

Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Neurosci* 2010;11:339–50.

Diehl LA, Pereira Nde S, Laureano DP, et al. Contextual fear conditioning in maternal separated rats: the amygdala as a site for alterations. *Neurochem Res*. 2014;39(2):384-393. doi:10.1007/s11064-013-1230-x

Eiland L¹, Romeo RD. *Neuroscience*. Stress and the developing adolescent brain. 2013 Sep 26;249:162-71. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.048. Epub 2012 Nov 2.

Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*. 2010;65(1):7-19. doi:10.1016/j.neuron.2009.11.031.

Farr S.A., Banks W.A., Morley J.E., Effects of leptin on memory processing, *Peptides* 27 (2006) 1420–1425.

Flippo KH, Strack S (2017) Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity. *J Cell Sci* 130:671–681.

Floriou-Servou A, von Ziegler L, Stalder L, et al. Distinct Proteomic, Transcriptomic, and Epigenetic Stress Responses in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Biol Psychiatry*. 2018;84(7):531-541. doi:10.1016/j.biopsych.2018.02.003

Gainey SJ, Kwakwa KA, Bray JK, et al. Short-Term High-Fat Diet (HFD) Induced Anxiety-Like Behaviors and Cognitive Impairment Are Improved with Treatment by Glyburide. *Front BehavNeurosci*. 2016;10:156. Published 2016 Aug 11. doi:10.3389/fnbeh.2016.00156

García-Prieto CF, Pulido-Olmo H, Ruiz-Hurtado G, et al. Mild caloric restriction reduces blood pressure and activates endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway in obese Zucker rats. *VasculPharmacol*. 2015;65-66:3-12. doi:10.1016/j.vph.2014.12.001

Gaskin, P.L., Alexander, S.P., Fone, K.C., 2014. Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of ‘schizophrenia-like’ behaviour in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 2533–2545.

Geiker NRW, Astrup A, Hjorth MF, Sjödin A, Pijls L, Markus CR. Does stress influence sleep patterns, food intake, weight gain, abdominal obesity

and weight loss interventions and vice versa?. *Obes Rev.* 2018;19(1):81-97. doi:10.1111/obr.12603

Granholm, A.C., Bimonte-Nelson, H.A., Moore, A.B., Nelson, M.E., Freeman, L.R., Sambamurti, K., 2008. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J. Alzheimers Dis.* 14, 133–145

Guo Z., Jiang H., Xu X., Duan W., Mattson M.P., Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 1754–1763.

Han TK, Leem YH, Kim HS. Treadmill exercise restores high fat diet-induced disturbance of hippocampal neurogenesis through β 2-adrenergic receptor-dependent induction of thioredoxin-1 and brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 2019;1707:154–163.

Haleem D.J., Haque Z., Inam Q.U., Ikram H., Haleem M.A., Behavioral, hormonal and central serotonin modulating effects of injected leptin, *Peptides* 74 (2015) 1–8.

Haleem DJ, Mahmood K. Brain serotonin in high-fat diet-induced weight gain, anxiety and spatial memory in rats [published online ahead of print, 2019 May 22]. *NutrNeurosci.* 2019;1-10. doi:10.1080/1028415X.2019.1619983.

Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Ver*, 2010; 23:270–99.

He J, Crews FT. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 86: 327–333; 2007.

Hosseini SGS.¹, Khatamsaz S.², Shariati M¹ The Effects of Losartan on Memory Performance and Leptin Resistance Induced by Obesity and High-Fat Diet in Adult Male Rats *Iran J Basic Med Sci* 2014 Jan;17(1):41-8.

Ishida-Takahashi R, Uotani S, Abe T, et al. Rapid inhibition of leptin signaling by glucocorticoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19658-19664. doi:10.1074/jbc.M310864200

Izadi, *et al.* Effects of Isolation and Social Subchronic Stresses on Food Intake and Levels of Leptin, Ghrelin, and Glucose in Male Rats. *Subchronic psychological stresses and food intake*, 2018.

Ji-Hong Liu^{1 2}, Qiang-Long You^{1 2}, Mei-Dan Wei³, Qian Wang^{1 2}, Zheng-Yi Luo^{1 2}, Song Lin^{1 2}, Lang Huang^{1 2}, Shu-Ji Li^{1 2}, Xiao-Wen Li^{1 2}, Tian-Ming Gao^{4 5} Social Isolation During Adolescence Strengthens Retention of Fear Memories and Facilitates Induction of Late-Phase Long-Term Potentiation. *Mol Neurobiol*. 2015 Dec;52(3):1421-1429.

Jones, C.A., Brown, A.M., Auer, D.P., Fone, K.C., 2011. The mGluR2/3 agonist LY379268 reverses post-weaning social isolation-induced recognition memory deficits in

the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 214, 269–283.

Juruena MF et al. Receptores de glicocorticóides e depressão. *Rev Bras Psiquiatr* 2004;26(3):189-201

Kaczmarczyk MM, Machaj AS, Chiu GS, et al. Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(9):1553-1564. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.01.004

Kanoski S.E., Davidson T.L., Different patterns of memory impairments accompany short- and longer-term maintenance on a high-energy diet, *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 36 (2010) 313–319

Kanoski S.E., Meisel R.L., Mullins A.J., Davidson T.L., The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat, *Behav. Brain Res.* 182 (2007) 57–66.

Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neuro- genesis. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14:186–91.

Keyes KM. &Hatzenbuehler ML. &Hasin DS. Stressful life experiences, alcohol consumption, and alcohol use disorders: the epidemiologic evidence for four main types of stressors. *Psychopharmacology* (2011) 218:1–17 DOI 10.1007/s00213-011-2236-1

Khazen, T., Hatoum, O.A., Ferreira, G. *et al.* Acute exposure to a high-fat diet in juvenile male rats disrupts hippocampal-dependent memory and plasticity through glucocorticoids. *Sci Rep* 9, 12270 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48800-2>

Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS ONE* 2010;5:e11376.

Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Pettenuzzo LF, Weis SN, Marcolin ML, Huffell AP, Mota CS, Dalmaz C. Isolation Stress Exposure and Consumption of Palatable Diet During the Prepubertal Period Leads to Cellular Changes in the Hippocampus *Neurochem Res* 2013 feb;38(2):262-72.

Krolow, R., Noschang, C., Weis, S.N. *et al.* Isolation Stress During the Prepubertal Period in Rats Induces Long-Lasting Neurochemical Changes in the Prefrontal Cortex. *Neurochem Res* 37, 1063–1073 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0709-1>

Ladyman SR, Grattan DR. JAK-STAT and feeding. *JAKSTAT* 2013;2:e23675.

Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Torner, L., 2012. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37,410–420

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11032–7.

Lapiz, M.D., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., Marsden, C.A. Influence of post weaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci. Behav. Physiol.* 33,13–29, 2003.

Leussis MP, Andersen SL. Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse*. 2008;62(1):22-30. doi:10.1002/syn.20462

Liu JH, You QL, Wei MD, et al. Social Isolation During Adolescence Strengthens Retention of Fear Memories and Facilitates Induction of Late-Phase Long-Term Potentiation. *Mol Neurobiol*. 2015;52(3):1421-1429. doi:10.1007/s12035-014-8917-0

Madiehe A M, Lin L., White C., Braymer HD., Bray GA, York DA. Constitutive Activation of STAT-3 and Downregulation of SOCS-3 Expression Induced by Adrenalectomy *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Dec;281(6):R2048-58.

McCormick C.M., Mathews I.Z.. HPA function in adolescence: Role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 86 (2007) 220–233

McGregor G, Harvey J. Regulation of Hippocampal Synaptic Function by the Metabolic Hormone, Leptin: Implications for Health and Neurodegenerative Disease. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:340. Published 2018 Oct 16. doi:10.3389/fncel.2018.00340.

McIntosh, A.L., Ballard, T.M., Steward, L.J., Moran, P.M., Fone, K.C., 2013. The atypical antipsychotic risperidone reverses the recognition memory deficits induced by post-weaning social isolation in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 228, 31–42.

Miao T., Wu D., Zhang Y., Bo X., Subang M.C., Wang P., Richardson P.M., Suppressor of cytokine signaling-3 suppresses the ability of activated signal transducer and activator of transcription-3 to stimulate neurite growth in rat primary sensory neurons, *J. Neurosci.* 26 (2006) 9512–9519.

Okada R. Fujiwara H., Mizuki D., Araki R., Yabe T., Matsumoto K. Involvement of dopaminergic and cholinergic systems in social isolation-induced deficits in social affiliation and conditional fear memory in mice. *Neuroscience*, volume 299, 23 July 2015, Pages 134-145

Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K., Flegal, K.M., 2012. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999–2010. *JAMA* 307, 483–490.

Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joels M, Lucassen PJ. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci* 2007;26: 3395–401.

Park HR. ¹/₃, Park M., Choi J., Park KY, Chung HY, Lee J. A High-Fat Diet Impairs Neurogenesis: Involvement of Lipid Peroxidation and Brain-Derived Neurotrophic Factor *Neurosci Lett* 2010 Oct 4;482(3):235-9.

Paulus K., Schulz C., Lehnert H., Central nervous effects of leptin and insulin on hippocampal leptin and insulin receptor expression following a learning task in Wistar rats, *Neuropsychobiology* 51 (2005) 100–106.

Pisu M.G., A. Garau, G. Boero, F. Biggio, V. Pibiri, R. Dore, V. Locci, E. Paci, P. Porcu, M. Serra, Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. *Neuroscience*, Volume 320, 21 April 2016, Pages 172-182

Praag HV., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H., Functional neurogenesis in the adult hippocampus, *Nature* 415 (2002) 1030–1034.

Quan, M.N., Tian, Y.T., Xu, K.H., Zhang, T., Yang, Z., 2010. Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. *Neuroscience* 169, 214–222.

Raun SH, Ali M, Kjøbsted R, Møller LLV, Federspiel MA, Richter EA, Jensen TE, Sylow L. Rac1 muscle knockout exacerbates the detrimental effect of high-fat diet on insulin-stimulated muscle glucose uptake independently of Akt. *J Physiol.* 2018 Jun;596(12):2283-2299.

Reichelt AC, Rank MM. The impact of junk foods on the adolescent brain. *Birth Defects Res.* 2017;109(20):1649-1658. doi:10.1002/bdr2.1173

ROMEO RD. Adolescence: a central event in shaping stress reactivity. *Developmental Psychobiology.* 52 244–253; 2010.

Ruiz R., Roque A., Pineda E., Licon-Limón P., Valdéz-Alarcón JJ. , Lajud N. Early Life Stress Accelerates Age-Induced Effects on Neurogenesis, Depression, and Metabolic Risk, *Psychoneuroendocrinology.* 2018 Oct;96:203-211.

Serra M.,PisuMG,Floris I. &BiggioG.Social isolation-induced changes in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. Pages 259-264 | Received 01 Jul 2005, Accepted 28 Nov 2005, Published online: 07 Jul 2009

Sobesky JL, D'Angelo HM, Weber MD, et al. Glucocorticoids Mediate Short-Term High-Fat Diet Induction of Neuroinflammatory Priming, the NLRP3 Inflammasome, and the Danger Signal HMGB1. *eNeuro.* 2016;3(4):ENEURO.0113-16.2016. Published 2016 Aug 30. doi:10.1523/ENEURO.0113-16.2016

Spencer SJ., D'Angelo H., Soch A., Watkins LR., Maier SF., and Barrientos RM. High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal- and amygdalar-dependent memory. *Neurobiol Aging.* 2017 October ; 58: 88–101. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.014.

Suri, D., Bhattacharya, A., Vaidya, V.A., 2014. Early stress evokes temporally distinct consequences on the hippocampal transcriptome, anxiety and cognitive behaviour. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 289–301

Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus. *Front Neurol Neurosci.* 2014;34:18-25.

Tomiyama A.J. et al. Leptin concentrations in response to acute stress predict subsequent intake of comfort foods. *Physiology & Behavior* 107 (2012) 34–39

Toniazzo A. P., Arcego D.M., Lazzaretti C. et al. Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats. *Nutrition* 50 (2018) 18–25.

Toniazzo AP, Arcego DM, Lazzaretti C, Mota C, Schnorr CE, Pettenuzzo LF, Krolow R, Fonseca Moreira JC, Dalmaz C Sex-dependent effect on mitochondrial and oxidative stress parameters in the hypothalamus induced by prepubertal stress and access to high fat diet. *Neurochem Int.* 2019 Mar;124:114-122. doi: 10.1016/j.neuint.2019.01.008. Epub 2019 Jan 11. PMID: 30639195

Van Doorn C, Macht VA, Grillo CA, Reagan LP. Leptin resistance and hippocampal behavioral deficits. *PhysiolBehav.* 2017;176:207-213. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.002

Valladolid-Acebes I, Stucchi P, Cano V, et al. High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;95(1):80-85. doi:10.1016/j.nlm.2010.11.007

Valentim, L.M., et al., Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoprecipitation in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience*, 2003. 118(2): p. 379-86.

Vos M, Lauwers E, Verstreken P (2010) Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Front Synaptic Neurosci* 2:139

Wang, J., Lloyd-Evans, B., Giacco, D. *et al.* Social isolation in mental health: a conceptual and methodological review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 52, 1451–1461 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00127-017-1446-1>

Warburton EC, Brown MW. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav Brain Res*. 2015;285:131-139. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.050

Watson, D.J., Marsden, C.A., Millan, M.J., Fone, K.C., 2012. Blockade of dopamine D(3) but not D(2) receptors reverses the novel object discrimination impairment produced by post-weaning social isolation: implications for schizophrenia and its treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 471–484.

Watt MJ, Weber MA, Davies SR, Forster GL. Impact of juvenile chronic stress on adult cortico-accumbal function: Implications for cognition and addiction. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;79(Pt B):136-154. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.06.015

Weitzdörfer R, Höger H, Shim KS, Cekici L, Pollak A, Lubec G. Changes of hippocampal signaling protein levels during postnatal brain development in the rat. *Hippocampus*. 2008;18(8):807-813. doi:10.1002/hipo.20441

Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 2006;16:296–304.

Wojtowicz JM, Askew ML, Winocur G. The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *Eur J Neurosci* 2008;27:1494–502

Wongchitrat P, Lansubsakul N, Kamsrijai U, Sae-Ung K, Mukda S, Govitrapong P. Melatonin attenuates the high-fat diet and streptozotocin-induced reduction in rat hippocampal neurogenesis. *Neurochem Int*. 2016;100:97–109.

Xia N, Li H. Loneliness, Social Isolation, and Cardiovascular Health. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(9):837-851. doi:10.1089/ars.2017.7312

Yang J., Liao X., Agarwal M.K., Barnes L., Auron P.E., Stark G.R., Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB, *Genes Dev*. 21 (2007) 1396–1408.

Yildirim M, MAPP OM, JANSSEN WGM, YIN WL, MORRISON JH, GORE AC. Postpubertal decrease in hippocampal dendritic spines of female rats. *Experimental Neurology*. 210: 339–348; 2008.

Yook JS. ^{1,2}; Rakwal R. , Shibato J, Takahashi K, Koizumi H., Shima T, Ikemoto MJ., Oharomari LK., McEwen BS, Soya H. Leptin in Hippocampus Mediates Benefits of Mild Exercise by an Antioxidant on Neurogenesis and Memory Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 May 28;116(22):10988-10993.

Yu H, Deng J, Zuo Z. High-fat diet reduces neuroprotection of isoflurane post-treatment: Role of carboxyl-terminal modulator protein-Akt signaling. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Nov;22(11):2396-405

Zenk SN¹, Schulz AJ, Izumi BT, Mentz G, Israel BA, Lockett M. Neighborhood food environment role in modifying psychosocial stress-diet relationships. *Appetite*. 2013 Jun;65:170-7. doi: 10.1016/j.appet.2013.02.008. Epub 2013 Feb 13.

Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M., & DiMarchi, R. (2005). *Leptin: Structure, Function and Biology*. *Vitamins & Hormones*, 345–372. doi:10.1016/s0083-6729(05)71012-8

Zorzo C, Méndez-López M, Méndez M, Arias JL. Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Behav Brain Res*. 2019; 365:170-177. doi:10.1016/j.bbr.2019.03.011

Zou X, Zhong L, Zhu C, et al. Role of Leptin in Mood Disorder and Neurodegenerative Disease. *Front Neurosci*. 2019;13:378. Published 2019 May 3. doi:10.3389/fnins.2019.00378

10. Lista de figuras

Figura 1: Avaliação das calorias consumidas ao longo do tempo, a partir do início do tratamento, aos 21 dias de idade.

Figura 2. Peso corporal ao longo do tempo

Figura 3. Velocidade média e distância percorrida na arena de campo aberto.

Figura 4. Efeito do estresse no início da vida e do acesso à dieta rica em gordura no tempo de congelamento na tarefa de medo condicionado ao contexto.

Figura 5. Efeito do estresse no início da vida e do acesso à dieta rica em gordura no desempenho na tarefa de realocação de objetos.

Figura 6. Avaliação do comportamento do tipo ansioso após consumo crônico de dieta rica em gordura em animais expostos ou não ao estresse na pré-puberdade.

Figura 7. Efeito do estresse por isolamento no período pré-puberdade e acesso crônico a uma dieta rica em gordura na neurogênese no giro dentado dorsal.

Figura 8. Funcionalidade mitocondrial no hipocampo dorsal, demonstrada pela relação potencial/massa mitocondrial, em animais submetidos ou não ao estresse de isolamento no período pré-púbere e recebendo ou não dieta com alto teor de gordura.

Figura 9. Efeito do estresse por isolamento social no período pré-puberdade e acesso crônico a uma dieta rica em gorduras em fatias de hipocampo em cultura em solução com leptina ou solução basal (meio). Os resultados mostram o imunocontéudo de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da leptina na sua forma fosforilada e sua forma total.