

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

Ariadni Mesquita Peres

**ESTUDO DO CONSUMO DE AZEITE DE OLIVA SOBRE O CONTROLE
HOMEOSTÁTICO E HEDÔNICO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE
RATOS ADOLESCENTES SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO MATERNA**

Porto Alegre

2021

Ariadni Mesquita Peres

**ESTUDO DO CONSUMO DE AZEITE DE OLIVA SOBRE O CONTROLE
HOMEOSTÁTICO E HEDÔNICO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE
RATOS ADOLESCENTES SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO MATERNA**

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.

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Rachel Krolow S.S. Bast

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Peres, Ariadni Mesquita
Estudo do Consumo de Azeite de Oliva sobre o
Controle Homeostático e Hedônico do Comportamento
Alimentar de Ratos Adolescentes Submetidos à Separação
Materna / Ariadni Mesquita Peres. -- 2021.
73 f.
Orientadora: Rachel Krolow.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Comportamento alimentar. 2. Separação materna.
3. Azeite de oliva. 4. Controle hedônico. 5. Controle
homeostático. I. Krolow, Rachel, orient. II. Título.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Ari e Terezinha, por todo o apoio, dedicação, por vibrarem por toda conquista e, principalmente, por todo amor. Sem vocês nada disso seria possível, vocês são meus combustíveis para dar o meu melhor diariamente. Por isso, essa e todas as vitórias da minha vida eu dedico a vocês sempre. Estamos sempre juntos, amo muito vocês!

Ao meu amado namorado, Bruno, agradeço pelo companheirismo, pelo apoio, amizade, respeito, amor e por tornar meus dias mais leves e felizes. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me fortalecendo. Que possamos realizar todos os nossos sonhos juntos, sempre com um sorriso no rosto. Eu te amo!

A minha querida orientadora, Rachel Krolow, obrigada pela confiança, pela oportunidade e por abrir as portas do seu laboratório para mim. Fostes amiga, professora e uma orientadora maravilhosa. Obrigada pela motivação diária, pelo incentivo em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho, sempre demonstrando amor e parceria em todas as etapas. És pura inspiração!

As minhas colegas do laboratório 25, obrigada por tudo! Sem o apoio e parceria de vocês seria impossível produzir este trabalho. Obrigada pelo companheirismo, paciência e por fazerem os dias no laboratório mais felizes. Agradeço especialmente à Alessandra, por todo conhecimento que compartilhou comigo desde o primeiro dia, pelo apoio e por dividir todos os momentos dessa jornada, sem tua ajuda este trabalho não existiria. Obrigada à Andressa pela amizade, parceria, por todo auxílio durante os experimentos e por trazer leveza ao nosso laboratório. Agradeço também aos colegas do laboratório 37 pela ajuda em todos os experimentos realizados neste trabalho.

Agradeço aos meus queridos amigos, que tornaram os dias mais felizes e leves, mesmo a distância. Que sempre torcem verdadeiramente pelas minhas conquistas, que acreditam no meu potencial e que torcem pela minha felicidade. Vocês são essenciais na minha vida e têm um espaço especial no meu coração. Amo vocês!

Agradeço imensamente aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq, PROPESQ e FAPERGS, pois sem o apoio financeiro a pesquisa se torna inviável.

SUMÁRIO

PARTE I	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. O ambiente e a relação entre mãe e filhote	10
1.2. Adolescência: um período sensível para as recompensas naturais	10
1.3. Neurobiologia do comportamento alimentar	12
1.4. Estresse no início da vida influencia o metabolismo e o comportamento alimentar	16
1.5. Azeite de oliva: Uma estratégia nutricional para modular o metabolismo e o comportamento alimentar no início da vida	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
PARTE II	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Aspectos éticos	26
4.2. Animais	26
4.3. Protocolo e composição das dietas	28
4.4. Avaliação do consumo e peso corporal dos animais	29
4.5. Tarefas comportamentais no período da adolescência	30
4.6. Preparo das amostras	32
4.7. Avaliação do imunocnteúdo de proteínas por Western blotting	32
4.8. Determinação de níveis de leptina, colesterol total, triglicerídeos e glicose por técnica de ELISA	33
4.9. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34

5.1. Resultados sobre consumo alimentar e peso corporal	34
5.2. Níveis plasmáticos de leptina, glicose, colesterol total e triglicerídeos durante o período da adolescência	36
5.3. Resultados das tarefas de campo aberto e claro/escuro	36
5.4. Resultados sobre corredor alimentar/ busca de alimentos palatáveis	39
5.5. Resultados sobre tarefa da novidade e consumo de alimentos doces na caixa moradia....	43
5.6. Resultados Western Blotting	44
5.7. Avaliação do ciclo estral.....	47
PARTE III	48
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	54
8. PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A - Carta de Aprovação da CEUA	71
ANEXO B - Composição lipídica do óleo de soja utilizado	72

PARTE I

RESUMO

Durante o início da gestação até os primeiros dias de vida dos roedores, o desenvolvimento cerebral é intenso e vários circuitos envolvidos com o comportamento alimentar são sensíveis à influência de fatores ambientais. A exposição ao estresse nos primeiros dias de vida desencadeia respostas fisiológicas que podem programar o estado metabólico e o comportamento alimentar dos animais no período da adolescência. Essa programação pode levar a um aumento no consumo de alimentos palatáveis, ganho de peso e comportamentos aditivos na vida adulta, de maneira sexo-específica. Nesse sentido, o consumo de azeite de oliva (AO) tem demonstrado reduzir o consumo calórico e o peso corporal, além de regular a neurotransmissão dopaminérgica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de AO durante a gestação e lactação sobre o controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar de ratos adolescentes submetidos à separação materna (SM). Ratas *Wistar* primíparas no primeiro dia gestacional foram alocadas em dois grupos: (1) ração padrão + óleo de soja (OS) e (2) ração padrão + AO. Após o nascimento, os grupos de filhotes foram subdivididos em: (1) Intacto OS; (2) Intacto AO; (3) Separado OS e (4) Separado AO. A SM ocorreu do dia pós-natal 1 ao 10, por 3 horas/dia. No desmame, os filhotes foram randomizados de acordo com o sexo e passaram a receber ração padrão do biotério. A partir de 32 dias de idade, ocorreram os testes comportamentais de campo aberto, corredor alimentar, consumo de alimentos palatáveis após a exposição às novidades, consumo de alimentos palatáveis na caixa moradia e claro/escuro. Na eutanásia, estruturas como núcleo accumbens (NAc) e área tegmental ventral (ATV) foram coletadas para análise de marcadores dopaminérgicos e de estresse. A análise estatística demonstrou que a SM aumentou o consumo de dietas ao longo do tempo em ambos os sexos. Além disso, a SM aumentou o ganho de peso e a eficiência calórica, especialmente nas fêmeas. Em relação ao consumo de alimento palatável nos testes comportamentais, foi visto que animais submetidos à SM e aumentaram o consumo no corredor alimentar e na sua caixa moradia. AO aumentou o consumo de alimento doce antes e após a novidade. Além disso, ambos fatores (SM e AO) aumentaram o consumo de alimento doce no corredor alimentar, mas esses fatores não foram somatórios. Após a exposição à novidade, animais separados e provenientes de mães que receberam AO consumiram mais o alimento palatável. Quanto aos achados bioquímicos, foi visto que os animais separados diminuíram os níveis plasmáticos de triglicérides, mas especialmente nas fêmeas esse aumento foi prevenido pelo consumo de AO. Houve também uma interação entre os fatores (sexo, SM e dieta) estudados sobre os níveis plasmáticos de leptina e do imunoconteúdo do receptor tipo 1 do hormônio liberador de corticotropina (CRHR1) na ATV. Nós observamos que os machos submetidos à SM diminuíram os níveis plasmáticos de leptina, e aumentaram o imunoconteúdo de CRHR1, mas o consumo de AO preveniu os efeitos induzidos pela SM. Já as fêmeas apresentaram resultados contrários aos observados nos machos. No entanto, em ambos os sexos, foi observado uma interação entre SM e AO, sugerindo que a SM reduziu o imunoconteúdo do receptor D2 de dopamina no NAc e o consumo de AO preveniu esses efeitos. Os nossos achados demonstraram que a nutrição materna e a SM influenciaram e programaram o controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar de forma sexo-específica. A SM contribuiu para disfunções no comportamento alimentar, tornando os animais mais vulneráveis ao consumo de alimentos palatáveis. Já o consumo de AO contribuiu para contrapor os efeitos induzidos pelo estresse, sugerindo que este tipo de óleo pode modular e, por vezes, atenuar os efeitos da SM.

Palavras-chave: Comportamento alimentar; Separação materna; Azeite de oliva; Controle hedônico; Controle homeostático.

ABSTRACT

Since the beginning of pregnancy until the first days of life of rodents, brain development is intense, and several circuits involved with feeding behavior are sensitive to the influence of environmental factors. Exposure to stress in the first days of life triggers physiological responses that can program the metabolic state and feeding behavior of animals during adolescence. Such programming can lead to an increase in the consumption of palatable foods, weight gain and addictive behaviors in adulthood, in a sex-specific way. In this sense, the consumption of olive oil (OO) has been shown to reduce caloric consumption and body weight, in addition to regulating dopaminergic neurotransmission. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of OO consumption during pregnancy and lactation on homeostatic and hedonic control of the feeding behavior of adolescent rats submitted to maternal separation (MS). Primiparous Wistar rats on the first gestational day were divided into two groups: (1) standard chow + soy oil (SO) and (2) standard chow + OO. After birth, groups of puppies were subdivided into: (1) Intact SO; (2) Intact OO; (3) Separated SO and (4) Separated OO. MS occurred from postnatal day 1 to 10, for 3 hours / day. At weaning, the pups were randomized according to sex and started to receive standard chow. From 32 days of age, behavioral tests started: open field, motivation to seek palatable food, novelty suppressed feeding test, consumption of palatable food in home cage and light / dark. In euthanasia, structures such as nucleus accumbens (NAc) and ventral tegmental area (VTA) were collected for analysis of dopaminergic markers and stress. Statistical analysis demonstrated that MS increased dietary intake over time in both sexes. In addition, MS increased weight gain and caloric efficiency, especially in females. Regarding the consumption of palatable food in the behavioral tests, it was seen that animals submitted to MS increased consumption in the test of motivation to seek palatable food and in their home cage. OO increased the consumption of sweet food before and after the novelty. In addition, both factors (MS and OO) increased the consumption of sweet food in the test of motivation to seek palatable food test, but these factors were not summation. After exposure to the novelty, animals separated from mothers who received OO consumed more palatable food. As for the biochemical findings, it was seen that the separated animals decreased the plasma levels of triglycerides, but especially in females this increase was prevented by the consumption of OO. There was also an interaction between the factors (sex, MS and diet) studied on plasma leptin levels, and the immunocontent of the type 1 of corticotropin-releasing hormone (CRHR1) in VTA. We observed that males submitted to MS decreased plasma leptin levels and increased CRHR1 immunocontent, but the consumption of OO prevented the effects induced by MS. Females, on the other hand, presented contrary results to those observed in male rats. However, in both sexes, an interaction between MS and OO was observed, suggesting that MS reduced the dopamine D2 receptor immunocontent in NAc and the consumption of OO prevented these effects. Our findings showed that maternal nutrition and MS influenced and programmed homeostatic and hedonic control of eating behavior in a sex-specific way. MS contributed to dysfunctions in eating behavior, making animals more vulnerable to consumption of palatable food. The consumption of OO contributes to counteract the effects induced by stress, suggesting that this type of oil can modulate and, sometimes, mitigate the effects of MS.

Key words: Feeding behavior; Maternal separation; Olive oil; Hedonic control; Homeostatic control.

LISTA DE ABREVIATURAS

DPN - Dia pós-natal

NAc - Núcleo accumbens

NPY - Neuropeptídeo Y

AGRP - Peptídeo ligado à proteína Agouti

ATV - Área tegmental ventral

CPF - Córtex pré-frontal

DA - Dopamina

AMP - Adenosina monofosfato

DARPP-32 - Fosfoproteína neuronal regulada por dopamina

CREB - Elemento responsivo ao AMP cíclico

HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

SM - Separação materna

CRHR1 - Receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina

CRHR2 - Receptor 2 do hormônio liberador de corticotropina

AO - Azeite de oliva

OS - Óleo de soja

D2R - Receptor 2 de dopamina

DAT - Transportador de dopamina

TH - Tirosina hidroxilase

1. INTRODUÇÃO

1.1. O ambiente e a relação entre mãe e filhote

A presença da mãe durante os primeiros dias ou semanas de vida é de extrema importância para a prole, devido a grande vulnerabilidade do período. A mãe exerce um comportamento que visa nutrir, proteger, aquecer e manter contato físico com a prole (Liu et al., 1997). O período perinatal, que compreende desde o início da gestação até a primeira infância dos roedores, é consideravelmente influenciado por fatores ambientais, como o estado nutricional da mãe ou a ocorrência de eventos estressores (Miller & Georgieff, 2017).

Essas intervenções ambientais podem induzir uma programação no comportamento e metabolismo da prole. O termo programação descreve o quanto o feto ou animal recém nascido sente e responde ao ambiente ao qual está inserido e de que maneira isso pode influenciar a organogênese e a função orgânica a longo prazo (Entringer et al., 2012). Dessa forma, o estado nutricional materno durante a gravidez é um fator relevante para o ambiente intrauterino, pois a fisiologia da prole pode ser alterada, dependendo da qualidade e/ou quantidade de alimento ingerido pela mãe (Reynolds et al., 2017). Além disso, os nutrientes que a mãe ingere são responsáveis por fornecer energia, proteínas e ácidos graxos essenciais necessários para a realização de processos bioquímicos e de síntese de tecidos do sistema nervoso central (Rao et al., 2013). Por outro lado, experiências estressantes no início da vida podem programar o comportamento alimentar e alterar as escolhas e as quantidades dos alimentos ingeridos em fases mais tardias da vida como a adolescência e a idade adulta (Maniam & Morris, 2012).

1.2. Adolescência: um período sensível para as recompensas naturais

A adolescência nos roedores compreende o intervalo entre os dias pós-natal (DPN) 21 a 59 (Laviola et al., 2003; Lukkes et al., 2009; L. P. Spear, 2000; Tirelli et al., 2003). Esse intervalo também pode ser dividido em adolescência precoce (DPN 21-34), intermediária (DPN 34-46) e tardia (DPN 46-59), podendo ter pequenas variações com relação à espécie e ao gênero (Burke & Miczek, 2014). Esse período é caracterizado por diversas mudanças nos sistemas neurais e no comportamento (Brenhouse & Andersen, 2011; Wilmouth & Spear, 2009). Em várias regiões do sistema nervoso central, antes e depois da adolescência ocorre a superprodução de axônios, dendritos, sinapses e receptores (Eckenhoff & Rakic, 1991; Huttenlocher, 1979). Principalmente entre os dias PND 21-40, ocorre uma intensa maturação

encefálica e organização de circuitos relacionados com o comportamento motivado e com a recompensa no núcleo accumbens (NAc) e no estriado (Aya-Ramos et al., 2017; Linda Patia Spear & Varlinskaya, 2010). Durante esse período da adolescência, é possível observar um aumento das fibras dopaminérgicas, da atividade dopaminérgica e subsequente estabilização. Além disso, ocorre um aumento dos receptores dopaminérgicos e subsequente poda sináptica (Burke & Miczek, 2014). Além disso, é durante a adolescência que os roedores e também os humanos são mais sensíveis a recompensas naturais e a drogas de abuso (Erlanson-Albertsson, 2005). Com relação às recompensas naturais, o consumo abusivo de alimentos industrializados ricos em açúcar e gordura podem alterar a função e a sensibilidade do sistema dopaminérgico envolvido com os circuitos relacionados com a recompensa e isso pode induzir uma alteração no comportamento alimentar hedônico (Ahmed et al., 2013; Collins et al., 2015; Morin et al., 2017).

Os comportamentos caracterizados durante esse período envolvem a busca por novidade, interação social aumentada, tomada de riscos e impulsividade (Sturman & Moghaddam, 2011). Essa fase do desenvolvimento também apresenta grande vulnerabilidade ao estresse, aumentando a susceptibilidade de desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como depressão e ansiedade. É uma fase marcada por aumento no consumo de alimentos altamente calóricos, principalmente como uma forma de diminuir os estímulos emocionais negativos (Walker et al., 2017). Por exemplo, experiências estressantes no início da vida podem programar o comportamento alimentar e alterar as escolhas e as quantidades dos alimentos ingeridos em fases mais tardias da vida como a adolescência e a idade adulta (Lee et al., 2014; Maniam & Morris, 2010). Modelos experimentais baseados na recompensa explicam que ingerir alimentos altamente palatáveis (ricos em açúcar e/ou gordura) podem reduzir os efeitos induzidos pelo estresse (Aya-Ramos et al., 2017; Maniam et al., 2016). Uma vez que o cérebro em desenvolvimento caracteriza-se por alta neuroplasticidade, maturação e reorganização de diversos sistemas, a exposição a algum tipo de estresse no início da vida pode afetar a maturação de diversos sistemas envolvidos com a ingestão alimentar, como é o caso do sistema dopaminérgico, podendo desencadear uma disfunção dopaminérgica e contribuir para o surgimento da obesidade (Burke & Miczek, 2014; Dallman, 2010; Dallman et al., 2005; Kenny, 2011).

Diferenças sexo-específicas devem ser consideradas no desenvolvimento neural dos circuitos relacionados à recompensa. Evidências demonstram que estas diferenças relacionadas ao desenvolvimento neural podem desempenhar um papel fundamental nas diferenças

comportamentais em relação ao sexo (Friemel et al., 2010; Marshall et al., 2017; Walker et al., 2017; Willing & Juraska, 2015). Em mamíferos, o dimorfismo sexual começa durante períodos sensíveis do desenvolvimento como desfecho de uma combinação de eventos genéticos, ambientais e hormonais. Estas diferenças podem ser transitórias ou permanentes ao longo da vida (Becker et al., 2005). Em roedores, tais diferenças ocorrem inicialmente no período perinatal e posteriormente no período peripubertal (Becker, 2009). Porém, os dados sobre as diferenças entre machos e fêmeas no comportamento alimentar após um estresse no início da vida ainda são muito limitados e controversos. Isto deve-se ao fato de que poucos estudos avaliam o comportamento alimentar das fêmeas, impossibilitando estabelecer comparações entre os sexos. Estudos mostraram que as diferenças entre os sexos podem relacionar-se ao processo de maturação e plasticidade nas regiões dopaminérgicas do cérebro de acordo com os períodos de desenvolvimento, sendo mais expressivos durante a adolescência nas fêmeas, enquanto nos machos são mais evidentes na idade adulta (Becker et al., 2005; Chocyk et al., 2010). Leva-se em consideração também que, além do sexo, o tipo e o tempo de duração do estresse, bem como o período do desenvolvimento em que o estresse ocorre podem gerar diferentes respostas no comportamento alimentar.

1.3. Neurobiologia do comportamento alimentar

O comportamento alimentar é regulado por uma série de interações entre três níveis de eventos: (1) eventos psicológicos (percepção de fome, desejos e sensações hedônicas) e comportamentais (refeições, ingestão alimentar); (2) nível da fisiologia periférica e eventos metabólicos; (3) comunicação entre neurotransmissores e sinais metabólicos que ocorrem no sistema nervoso central. O apetite reflete a sincronização de eventos e processos nestes três níveis. (Blundell et al., 2001). Portanto, a manifestação do apetite e do comportamento alimentar reflete a sincronização de processos em três domínios: a) eventos neurais que têm como consequência um ato de comportamento alimentar seguido de experiências psicológicas relacionadas; b) cada ato deste comportamento desencadeia uma ação no sistema fisiológico periférico e c) tal ação é reproduzida com atividade cerebral neuroquímica, gerando o ato posterior de comportamento alimentar (Harrold et al., 2012).

A regulação do comportamento alimentar é dada, principalmente, por dois tipos de mecanismos: homeostático e hedônico (Harrold et al., 2012). O controle homeostático é mediado pela necessidade do organismo em manter as reservas de energia, sendo regulado por mediadores hormonais relacionados com a fome, saciedade e níveis de adiposidade. Neste

sistema, há a atuação de hormônios como leptina, grelina e insulina em circuitos cerebrais hipotalâmicos, estimulando ou inibindo a fome, a fim de manter o adequado balanço energético (Lutter & Nestler, 2009). O controle hedônico, ou regulação baseada na recompensa, pode se sobrepor à via homeostática durante períodos de relativa abundância de energia por aumentar o desejo de consumir alimentos altamente palatáveis ricos em açúcar e/ou gordura (Harrold et al., 2012).

1.3.1. Controle homeostático do comportamento alimentar

O hipotálamo é o centro do controle homeostático do apetite, atuando de forma a integrar a formação de energia transportada por nutrientes e hormônios para a periferia através de duas vias: neural e hormonal (Sasaki et al., 2016). Sinais metabólicos como os hormônios anorexígenos leptina e insulina, e a grelina como hormônio orexígeno podem exercer influência sobre uma variedade de funções cerebrais.

A leptina e a grelina são hormônios que agem de forma antagônica no controle do apetite. A leptina é um hormônio produzido e liberado, em grande parte, pelo tecido adiposo branco, agindo como um mensageiro que sinaliza a saciedade no hipotálamo, diminuindo, assim, a ingestão alimentar. No núcleo arqueado do hipotálamo, a leptina inibe a produção de dois potentes orexígenos, estimuladores da ingestão alimentar, neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo ligado à proteína Agouti (AGRP) (Ribeiro & Santos, 2013). Em situações de jejum, os níveis de leptina diminuem e o hipotálamo induz a fome, fazendo com que ocorra o aumento da ingestão alimentar com o objetivo de promover a homeostase (Romero & Zanesco, 2006). Leptina e grelina são hormônios que agem de forma antagônica no controle do apetite. A grelina é um hormônio produzido majoritariamente no estômago que apresenta função orexígena, estimulando a ingestão alimentar, aumentando a adipogênese, diminuindo a saciedade e promovendo um balanço energético positivo (Ribeiro & Santos, 2013). Outro fator de adiposidade é a insulina, um hormônio produzido pelas células beta pancreáticas que promove, entre outras funções, a captação de glicose e, conseqüentemente, o controle da glicemia. Assim como a leptina, a insulina tem a finalidade de regular o balanço energético (van de Sande-Lee & Velloso, 2012).

1.3.2. Controle hedônico do comportamento alimentar

O controle hedônico é mediado pela recompensa, ou seja, pelo desejo de consumir alimentos altamente palatáveis (Solfrizzi et al., 2006). Dessa forma, ocorre uma estimulação pelo consumo excessivo desses alimentos com base no prazer que os mesmos proporcionam e na recompensa sensorial, e não pela necessidade biológica (Harrold et al., 2012). Dessa forma, NAc, área tegmental ventral (ATV), hipotálamo lateral, amígdala e córtex pré-frontal (CPF) são regiões cerebrais ativadas por alimentos palatáveis ou reconfortantes.

Diversos sistemas de neurotransmissores podem estar envolvidos com o controle hedônico do comportamento alimentar, como é o caso da dopamina (DA), dos opioides e dos canabinóides (Berridge, 2009). Dentre os neurotransmissores citados, iremos destacar o sistema de neurotransmissão dopaminérgico. A DA está envolvida em funções locomotoras, secreção hormonal, comportamentos emocionais e recompensa (Berridge et al., 2016; Walker et al., 2017). Além disso, a DA é um fator essencial ao desenvolvimento do cérebro adolescente e também ao aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de doenças. O correto processamento dos sistemas que envolvem a DA é necessário para incorporar interações complexas entre vias neurais, eixos endócrinos e estímulos ambientais, a fim de gerar um sistema de recompensa funcional no período da vida adulta visto que estudos indicam que os adolescentes são mais sensíveis à recompensa do que os adultos (Walker et al., 2017).

A transmissão de DA envolve três vias principais: nigroestriatal, mesolímbica e mesocortical. A via dopaminérgica nigroestriatal se origina na substância negra do mesencéfalo e se projeta para o caudado putamen no estriado dorsal, atuando na regulação de funções motoras e comportamentos orientados a objetivos. A via mesolímbica, por sua vez, envia projeções da ATV do mesencéfalo para o NAc no estriado ventral e compreende processos de motivação e recompensa. Por fim, a via dopaminérgica mesocortical conecta à ATV ao CPF, regulando respostas cognitivas e de estresse (Majcher-Maślanka et al., 2017).

De forma integrada, ainda, o sistema mesocorticolímbico apresenta uma importância fundamental na atenção e atribuição de valor recompensador e/ou aversivo a estímulos motivacionais que podem alterar a sinalização dependente de DA e também alterar sua força sináptica (Coccorello, 2019). O sistema mesocorticolímbico, chamado de circuito da recompensa, engloba os sistemas mesocortical, com projeções da ATV para o CPF, e também o sistema límbico, com projeções do ATV para o NAc. Estes sistemas são centrais na regulação da recompensa alimentar e recebem uma abundante inervação de neurônios dopaminérgicos (Berridge et al., 2016).

Os efeitos da DA são mediados pela interação com cinco receptores diferentes, usualmente referidos como dos tipos D₁ (D₁ e D₅) e D₂ (D₂, D₃ e D₄). O receptor do tipo D₁ é responsável por estimular a adenilato ciclase, aumentar a concentração de adenosina monofosfato (AMP) cíclico e com isso desencadear uma série de fenômenos, incluindo a ativação da proteína cinase A, a qual fosforila, entre outros substratos, a fosfoproteína neuronal regulada por dopamina (DARPP-32). Com isso, inibe a ação de fosfatases, permitindo a fosforilação da proteína que liga o elemento responsivo ao AMP cíclico (CREB) no DNA. Já os receptores do tipo D₂, quando ativados, diminuem a concentração de AMP cíclico e com isso inibem a proteína cinase A e ativam as fosfatases, impedindo a fosforilação da CREB. Assim, dependendo do tipo de receptor ao qual a DA se liga, há uma resposta de sinalização diferenciada. Além disso, os receptores do tipo D₁ apresentam menor afinidade à DA enquanto que os receptores do tipo D₂ possuem maior afinidade pela mesma (Baik, 2013; Volkow et al., 2017). Então, o consumo de alimentos palatáveis pode desencadear uma grande liberação de DA transitoriamente e ativar os receptores do tipo D₁. Já os receptores do tipo D₂ são capazes de detectar níveis tônicos de liberação de DA, relacionados à liberação basal da mesma (Baik, 2013). A força sináptica e a taxa de renovação de DA no NAc é aumentada pelo acesso a soluções de sacarose, e aumentos da DA neste núcleo estão relacionados com maior ingestão de alimento doce (Coccarello & Maccarrone, 2018; Sasaki et al., 2016; Solfrizzi et al., 2006). Nesse sentido, alguns autores sugerem que no NAc, a função dos receptores D₁ parecem estar relacionada com a ativação de respostas orientadas pela recompensa e a função dos receptores D₂ parecem ter um papel na avaliação da recompensa (D'Aquila, 2010; Galistu & D'Aquila, 2012).

A regulação do sistema dopaminérgico têm recebido muita atenção nos últimos anos devido às consequências que sua disfunção pode trazer, como desenvolvimento de comportamentos aditivos e quadro de obesidade relacionada à recompensa alimentar, dois grandes problemas de saúde pública (Baik, 2013). Além disso, drogas aditivas e alimentos altamente palatáveis estão associados a características reforçadoras, motivadoras e até compulsivas que são codificadas pela neurotransmissão de DA dentro do sistema mesocorticolímbico (Salamone & Correa, 2012).

1.3.3. A integração entre os sinais homeostáticos e hedônicos do comportamento alimentar

Os receptores da leptina também são expressos no sistema mesolímbico, particularmente na ATV. A primeira evidência da modulação das vias de recompensa pela leptina surgiu com experimentos de estimulação intracraniana em roedores, onde se tornou possível verificar a presença de receptores metabolicamente ativos de leptina nos neurônios dopaminérgicos presentes na ATV (Fulton, S., Woodside, B., Shizgal, 2000). Após, um estudo demonstrou que a administração de leptina na região da ATV tinha capacidade de suprimir a atividade dos neurônios de DA, como também a liberação de DA do NAc de forma basal e induzida pela alimentação, bem como a diminuição da ingestão alimentar (Figlewicz et al., 2003). Após a descoberta da presença de receptores de leptina na região mesolímbica e a presença do receptor de grelina na ATV também foi demonstrada. A administração de grelina nesta região aumentou a ingestão de alimentos altamente palatáveis. No entanto, outro estudo verificou que a administração do antagonista do receptor de leptina reduziu o consumo de alimentos palatáveis (Naleid et al., 2005).

De modo geral, os sinais orexígenos homeostáticos aumentam a atividade dos neurônios de DA na região da ATV quando são expostos a estímulos alimentares, ao passo que os sinais anorexígenos inibem o disparo dos mesmos neurônios, gerando, como resultado, a diminuição da liberação de DA. Os neurônios da ATV e NAc expressam receptores para grelina, leptina e insulina, entre outros. Desta maneira, hormônios que têm influência no controle homeostático, podem afetar também o controle hedônico do comportamento alimentar (Sasaki et al., 2016).

1.4. Estresse no início da vida influencia o metabolismo e o comportamento alimentar

1.4.1. A resposta ao estresse no início da vida

A exposição ao estresse no início da vida gera consequências a longo prazo no desenvolvimento e esses efeitos podem persistir durante toda a vida do animal (Schroeder et al., 2018). A exposição ao estresse de forma aguda ou crônica desencadeia respostas fisiológicas que alteram o estado metabólico e comportamental dos animais (Dallman et al., 2003). O intervalo de tempo que compreende a infância e a adolescência é caracterizado por ser um período crítico para o desenvolvimento físico e mental, além de ser vulnerável aos efeitos do estresse (Brydges et al., 2015; He et al., 2020). A presença da mãe durante os primeiros dias ou

semanas de vida é de extrema importância devido a grande vulnerabilidade do período, pois a mãe fornece calor, proteção e alimento aos filhotes. E ainda, a relação entre mãe-filhote tem uma função crucial para controlar a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) da prole (Lehmann & Feldon, 2000; Schroeder et al., 2018).

O eixo HPA é ativado por neurônios hipotalâmicos presentes no núcleo paraventricular que secretam o hormônio liberador de corticotropina (CRH) que, por sua vez, desencadeia a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a partir da hipófise anterior. Via corrente sanguínea, o ACTH atinge as glândulas supra-renais e ativa a síntese e liberação, no córtex adrenal, de corticosterona em roedores que voltam ao cérebro a fim de se ligar aos receptores glicocorticóides (GR) e mineralocorticóides (MR). Os glicocorticóides quando ligados ao GR promovem uma cascata de ações metabólicas nos tecidos periféricos, a fim de responder de forma adequada à perturbação ambiental e, fornecer o feedback negativo no eixo HPA garantindo o retorno ao estado homeostático (Bale & Epperson, 2015; Maniam & Morris, 2012). O rato neonato é capaz de responder a estímulos estressantes com um aumento de corticosterona e do ACTH entre o primeiro e o segundo dia do nascimento. Após este período, os níveis basais de corticosterona diminuem de forma drástica e os filhotes apresentam alta resistência a estressores ambientais, período conhecido como hiporresponsivo (Lehmann & Feldon, 2000).

Dentre os diferentes modelos de estresse empregados em roedores nos estágios iniciais da vida, o estresse causado por separação materna (SM) é bem estabelecido na literatura. A SM envolve a separação dos filhotes de suas mães de forma única durante 24 horas ou separações repetidas tendo duração de cerca de 3 a 6 horas por dia, durante os primeiros dias de vida do animal. Estudos indicam que ratos expostos ao estresse de SM podem desenvolver depressão, comportamento tipo ansioso, déficits de aprendizado, perturbações cognitivas acompanhadas de anormalidades no eixo HPA, além de apresentarem alto risco de desenvolverem distúrbios alimentares na vida adulta devido a disfunção do eixo (Da Silva et al., 2014; Jahng, 2011; Schroeder et al., 2018). Além do mais, diversas evidências sugerem que a exposição a algum tipo de estresse no início da vida afeta também processos cognitivos que podem estar ligados ao controle do comportamento alimentar, como atenção e hiperatividade (Colorado et al., 2006; de Lima et al., 2020; de Souza et al., 2018, 2020; Spivey et al., 2009).

1.4.2. Efeitos do estresse sobre o metabolismo e o comportamento alimentar

Estudos epidemiológicos e em modelos animais indicam que experiências adversas no início da vida, como abuso físico e emocional ou estresse do tipo separação materna, podem programar o metabolismo e desencadear alterações metabólicas na idade adulta. Estudos epidemiológicos demonstraram que experiências adversas no início da vida ocorridas durante a infância aumenta o risco de desenvolvimento de obesidade mais tarde na vida (Hollingsworth et al., 2012; van Reedt Dortland et al., 2012; Wang et al., 2015) e gera aumento da circunferência abdominal (Midei et al., 2013; van Reedt Dortland et al., 2012). Além disso, é possível observar aumento da pressão arterial (Misiak et al., 2015), desenvolvimento de dislipidemia (Misiak et al., 2015; van Reedt Dortland et al., 2012), particularmente observado em homens (Spann et al., 2014). Em modelos animais foi observado um prejuízo na homeostase da glicose, diminuição da sensibilidade à insulina (Raff et al., 2018; Ruiz et al., 2018; Vargas et al., 2016), aumento da glicemia de jejum (Vargas et al., 2016), diminuição da tolerância à glicose (Ruiz et al., 2018), índices alterados de resistência à insulina (Raff et al., 2018) e dislipidemia (Baxi et al., 2012).

Com relação ao peso corporal dos animais que passaram por SM, os resultados são inconclusivos e variados, já que depende do protocolo de SM, da idade e do sexo do animal. Alguns estudos demonstram que fêmeas que passaram por esse estresse precoce como SM (DPN 2-21) ganham mais peso na idade adulta (Jaimes-Hoy et al., 2016). Um protocolo de SM (DPN 2-6, 90 min/dia), envolvendo diversos tratamentos experimentais, causou aumento de peso em machos e fêmeas na idade adulta (Gehrand et al., 2016; Raff et al., 2018). No entanto, outros estudos ou não demonstram nenhum efeito no peso corporal na idade adulta (Ilchmann-Diounou et al., 2019) ou demonstram perda de peso desses animais (Litvin et al., 2010). Ainda, fêmeas que passaram por SM apresentaram maior ganho de peso e massa gorda, sem mudanças no consumo de ração padrão (Jaimes-Hoy et al., 2016). Ryu e colaboradores (2009) mostraram que a SM por um período de 14 dias promoveu hiperfagia e ganho de peso durante o desenvolvimento, que persistiu até a idade adulta dos machos (Ryu et al., 2009).

A exposição ao estresse precoce gera uma preferência pela ingestão de alimentos palatáveis (Arcego et al., 2014; de Lima et al., 2020; Lee et al., 2014; Maniam et al., 2016). Animais que passaram pela SM apresentaram menor ingestão de ração padrão (de Souza et al., 2018, 2020) e preferência clara e aumentada por alimentos altamente palatáveis (Da Silva et al., 2014; Jahng, 2011; Schroeder et al., 2018). Além disso, os animais apresentaram níveis diminuídos de leptina circulante, associada a um prejuízo do desenvolvimento do hipotálamo

(Mela et al., 2016; Viveros et al., 2010). Machos e fêmeas submetidos ao modelo de privação materna por 36 horas, entre DPN 9 e 10, demonstraram níveis significativamente diminuídos de leptina circulantes, em comparação aos controles. Ainda, os níveis de mRNA hipotalâmico do receptor de leptina aumentaram significativamente em 24 horas após o estresse em ambos os sexos, normalizando em fêmeas após 36 horas de estresse, o que não foi visto em machos (Viveros et al., 2010).

Há uma ligação entre o estresse e a ativação do sistema de DA mesolímbica visto que o CRH também é liberado na ATV em resposta ao estresse agudo. Avaliações imunohistoquímicas demonstraram a presença do receptor tipo 1 do CRH (CRHR1) em neurônios ao longo da ATV que podem sintetizar DA e projetar-se para regiões do prosencéfalo, como o NAc (Sauvage & Steckler, 2001). Além disso, o CRHR1 está envolvido na sensibilização de neurônios dopaminérgicos na ATV, de forma a desempenhar um papel importante no controle da liberação de DA (Vasconcelos et al., 2020). Isto sugere que o CRH pode ser capaz de modular a neurotransmissão dopaminérgica em todo o sistema mesolímbico dos ratos, além de desempenhar um papel fundamental nas mudanças plásticas associadas ao estresse e ao uso de drogas (Lodge & Grace, 2005).

Existem também receptores de CRH distribuídos pelas regiões encefálicas associadas ao controle do processamento emotivo e regulação hormonal, bem como pelas regiões envolvidas nas ações de substâncias de abuso como mesencéfalo ventral, amígdala e CPF (Behan et al., 1996). Através dos seus receptores, o CRH está implicado em diversas ações biológicas como: ansiedade (Takahashi, 2001), depressão (Reul & Holsboer, 2002), apetite (Hope et al., 2000) e processamento central de recompensas (Sarnyai et al., 2001). O CRH modula de forma dependente da dose a atividade monoaminérgica por meio de dois subtipos de receptores, CRHR1 e receptor tipo 2 do CRH (CRHR2) (Kirby et al., 2000; Price et al., 1998), cada um com efeitos específicos de regiões distintas na liberação de serotonina e DA (Isogawa et al., 2000; Lukkes et al., 2009). A literatura aponta que o CRHR1 talvez seja o subtipo de receptor de CRH que inicia a resposta do eixo HPA, estando envolvido na modulação do eixo, além de comportamentos induzidos pelo estresse e com alterações cognitivas. De outro lado, o CRHR2 ainda tem seu papel em debate, já que os estudos em modelos animais ainda são inconclusivos, mas parece que esse subtipo de receptor reduz a ativação do CRHR1, reduzindo essa resposta inicial ao estresse, gerando respostas de redução da ansiedade e restauração dos processos celulares (Vasconcelos et al., 2020).

Evidências demonstram diferenças entre os sexos na ligação ao receptor de CRH durante o início da adolescência e idade adulta. As alterações sexualmente dimórficas foram vistas na ligação do receptor em diversas regiões límbicas como amígdala, hipocampo e NAc em ratos adolescentes e adultos. A ligação de CRHR1 no hipocampo foi maior em machos no DPN 30, seguida de diminuição na idade adulta (DPN 90). Por outro lado, em fêmeas foi visto um aumento de ligação de CRHR1 no NAc. Em relação aos níveis do receptor CRHR2, estes se mostraram aproximadamente iguais entre os sexos na amígdala, seguido de um aumento no DPN 30 até a idade adulta mais pronunciado em machos do que em fêmeas (Weathington & Cooke, 2012).

Uma vez que o cérebro em desenvolvimento caracteriza-se por alta neuroplasticidade, maturação e reorganização de diversos sistemas, a exposição a algum tipo de estresse no início da vida pode afetar a maturação e o funcionamento de diversos sistemas envolvidos com a ingestão alimentar (Burke & Miczek, 2014). Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos com o comportamento alimentar pode permitir estratégias para tentar prevenir a busca descontrolada pela recompensa e/ou hiperfagia associada ao ganho de peso em animais durante a adolescência.

1.5. Azeite de oliva: Uma estratégia nutricional para modular o metabolismo e o comportamento alimentar no início da vida

Cada vez mais tem-se buscado alternativas nutricionais para tentar modular o metabolismo, bem como o comportamento alimentar no início da vida. Neste contexto, o azeite de oliva (AO) torna-se um alimento interessante visto que o mesmo apresenta diversos benefícios à saúde, melhorando o comportamento e o metabolismo (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2016; Hwang et al., 2011; Giacomini et al., 2013; Turner et al., 2005).

Há indícios de que a nutrição materna durante o período de gestação e de lactação está diretamente relacionada ao desenvolvimento fetal adequado. É possível que dietas administradas nas mães podem programar o metabolismo da prole de forma a tentar prevenir os efeitos causados por algum tipo de estresse no início da vida. Dessa forma, tipos de ácidos graxos, proteínas e micronutrientes afetam diversos aspectos da programação fetal (Mennitti et al., 2015).

Os nutrientes ingeridos pela mãe impactam diretamente o desenvolvimento fetal, visto que a placenta desempenha várias funções a fim de garantir um ambiente ideal para a sobrevivência e o desenvolvimento da prole (Grigsby, 2016). A barreira entre o sangue fetal e

o materno é tênue, tornando a troca de oxigênio e nutrientes muito eficiente, além de facilitar o processo de armazenamento de lipídeos, produzindo alguns aminoácidos e contribuindo para o tamponamento das flutuações de glicose (Grigsby, 2016; Rao et al., 2013). Então, os nutrientes que a mãe ingere serão responsáveis por fornecer energia, proteínas, ácidos graxos essenciais, além de diversos outros micronutrientes necessários para a realização de processos bioquímicos e de síntese de tecidos do sistema nervoso central (Rao et al., 2013). Dentre os nutrientes que são facilmente transferidos da mãe para a prole, especialmente em roedores, coelhos e primatas, destaca-se os ácidos graxos e cetoácidos (Père, 2003).

Os ácidos graxos atuam como moléculas de sinalização e como sensores energéticos do centro hipotalâmico, podendo modificar o controle da homeostase energética (Moullé et al., 2014). A ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados possibilita o controle das oscilações do peso corporal via mecanismos que envolvem termogênese, oxidação de gordura e expressão de neuropeptídeos associados à saciedade (Coccarello & Maccarrone, 2018).

O azeite de oliva, principal fonte de gordura da dieta mediterrânea, é obtido através da extração mecânica das azeitonas, sem qualquer tratamento químico. Uma vez que a produção do AO não requer seu refino, os valores nutricionais e sensoriais são preservados, diferentemente de outros óleos vegetais em que estas características são total ou parcialmente removidas durante as etapas de refino (Genovese et al., 2015). Em maior proporção o AO apresenta o ácido graxo denominado ácido oleico (C18:1; ω 9), variando de 55 a 85%. Também é constituído, em quantidades razoáveis, de ácidos graxos essenciais, aqueles que provém apenas da dieta, como o ácido linoleico (C18:2, ω 6) e linolênico (C18:3, ω 3). Outros componentes importantes do AO são os tocoferóis, compostos fenólicos, minerais e vitaminas do complexo B, sendo uma fonte rica de antioxidantes com elevado poder biológico. Dentre os compostos fenólicos que compõem o AO encontram-se a oleuropeína, hidroxitirosol e tirosol. Destes, o hidroxitirosol atua como antioxidante principal e a oleuropeína e tirosol atuam como sequestradores de radicais livres (Mello & Pinheiro, 2012). As concentrações destes constituintes podem ser diferentes de um AO para o outro, uma vez que a concentração destes compostos são intimamente dependentes do clima, da zona de produção, variedade, latitude e do estágio de maturação da azeitona. Estes componentes são responsáveis por múltiplas funções biológicas e possuem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (Pase et al., 2015).

O ácido oleico tem uma relação bem importante com a albumina no desenvolvimento fetal. Estudos já demonstraram a presença de albumina dentro de células como neurônios e células gliais durante o desenvolvimento, sugerindo que estas células acumulam albumina durante os estágios iniciais de diferenciação e desenvolvimento do feto (Dziegielewska et al., 1981; Møllgård & Jacobsen, 1984; Uriel et al., 1983). Estas concentrações de albumina aumentam durante a gestação, atingindo um pico que coincide justamente com o estágio de desenvolvimento cerebral máximo e, depois disso, estes níveis diminuem drasticamente (Saunders & Møllgård, 1981). A albumina tem como uma das suas principais funções transportar ácidos graxos e, dessa forma, foi sugerido que a albumina poderia estar relacionada com o transporte de ácidos graxos durante o desenvolvimento cerebral dos roedores (Calvo et al., 1988). Dentre os seis sítios de ligação de ácidos graxos que a estrutura da albumina possui, três deles apresentam alta afinidade pelo ácido oleico (Spector & Fletcher, 1978).

O ácido oleico pode ser sintetizado pelas células astrocitárias, e sugere-se então que a ligação do mesmo atua de forma a aumentar radicalmente a fluidez das membranas biológicas, o que é necessário nos locais de novos axônios e/ou dendritos (Alberts et al, 1994). Sendo o ácido oleico o constituinte em maior concentração no AO, é evidente que este nutriente atua de várias maneiras no cérebro do roedor em desenvolvimento. Um estudo também mostrou a influência do ácido oléico sobre o comportamento alimentar e seus achados demonstraram que o uso de ácido oleico intra-área tegmentar ventral diminuiu a ingestão alimentar e aumentou a atividade locomotora. Além disso, atenuou os efeitos recompensadores de alimentos ricos em gordura/açúcar em uma tarefa operante e inibiu o disparo neuronal dos neurônios dopaminérgicos, demonstrando que o ácido oleico administrado intra-área tegmentar ventral foi capaz de suprimir a atividade neuronal da DA, bem como a busca de alimentos após a incorporação celular. Tais achados destacam a capacidade dos neurônios dopaminérgicos de atuarem como sensores metabólicos, respondendo não apenas aos hormônios mas também aos sinais de nutrientes para modular comportamentos direcionados a alimentos (Hryhorczuk et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Durante a adolescência, os animais são mais vulneráveis a recompensas naturais e ao uso de drogas de abuso, principalmente quando são submetidos a um estresse no início da vida. Essa busca por recompensas pode direcionar o organismo para o desenvolvimento de comportamentos aditivos, obesidade e síndrome metabólica. Assim, estratégias têm sido estudadas para tentar prevenir a busca descontrolada pela recompensa e/ou hiperfagia associada ao ganho de peso. Nesse sentido, o uso de dietas suplementadas com AO tem chamado a atenção nos estudos em modelo animal, uma vez que os compostos presentes no AO atuam no controle homeostático, reduzem o peso corporal e agem em neurônios dopaminérgicos reduzindo a ingestão alimentar e melhorando o perfil metabólico dos animais. Assim, uma dieta oferecida desde o período gestacional pode programar o metabolismo e o comportamento alimentar da prole a fim de atenuar os efeitos de um estresse precoce e evitar possíveis patologias como a obesidade e comportamentos aditivos na adolescência.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do consumo de azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre parâmetros do controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar de ratos adolescentes submetidos à separação materna.

3.2. Objetivos específicos

- Medir o consumo de dietas durante a gestação/lactação e o peso corporal da prole até o final da adolescência;
- Verificar a eficiência calórica da prole no final da adolescência;
- Avaliar os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações no plasma dos animais;
- Avaliar os níveis de leptina no plasma dos animais;
- Investigar a atividade locomotora, o comportamento tipo ansioso e o comportamento alimentar dos animais;
- Avaliar o imunoconteúdo de proteínas envolvidas na via de sinalização dopaminérgica no NAc de ratos adolescentes;
- Avaliar o imunoconteúdo da proteína tirosina hidroxilase e das proteínas CRHR1 e CRHR2 na área tegmentar ventral de ratos adolescentes;
- Investigar as diferenças sexo-específicas sobre os parâmetros avaliados.

PARTE II

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos éticos

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos seguindo os cuidados preconizados pelas diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008 e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em relação à experimentação animal (Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA) e eutanásia (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA), indicadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), bem como normativas internacionais como o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (publicação do NIH N° 80-23, revisado em 1996) e as normas do “*Canadian Council on Animal Care - CCAC*”. Aprovado pelo CEUA, sob o número 37803 (Anexo A).

4.2. Animais

Ratas *Wistar* primíparas no 1º dia de gestação foram separadas inicialmente em dois grupos: (1) mães alimentadas com óleo de soja (OS) acrescido à ração padrão do biotério e (2) mães alimentadas com AO acrescido à ração padrão do biotério. As dietas foram calculadas de forma a serem isocalóricas e foram preparadas utilizando farelo da ração padrão fornecidas pelo biotério (Nuvilab®) acrescidas de 4% de OS ou AO (Qosa et al., 2015). Foram mantidas duas mães por caixa moradia (41 x 34 x 16 cm) até o dia gestacional 18 e, após este período, todas as ratas foram alocadas individualmente até o nascimento dos filhotes.

Após o nascimento dos filhotes, os dois grupos iniciais (1 e 2) foram subdivididos conforme o protocolo de SM, totalizando 4 grupos experimentais: (1) intactos alimentados com ração padrão do biotério acrescida de OS, (2) intactos alimentados com ração padrão do biotério acrescida de AO, (3) separados alimentados com ração padrão do biotério acrescida de OS e (4) separados alimentados com ração padrão do biotério acrescida de AO. No dia de nascimento dos filhotes, considerado como DPN 0, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes de ambos os sexos. O protocolo de SM iniciou no DPN 1 e foi até o DPN 10. As ninhadas foram gentilmente retiradas do ninho e colocadas em uma incubadora com temperatura a 32°C, durante 3 horas por dia, entre 11 e 16 horas (ciclo claro). Cada ninhada foi manipulada sempre com a mesma luva e teve seu próprio recipiente dentro da incubadora. As mães permaneceram em suas caixas moradia na mesma sala da incubadora, permitindo troca de vocalizações com

os filhotes. A maravalha da caixa moradia foi trocada por maravalha limpa pelo pesquisador responsável, sem perturbar a área do ninho. Os grupos de animais que não passaram por nenhuma intervenção até o desmame foram chamados de grupo intacto. No desmame, DPN 21, os filhotes foram randomizados, separados por sexo e grupos experimentais e alojados em 3-4 por caixa moradia (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos experimentais

Machos	Intactos provenientes de mães que consumiram ração padrão + óleo de soja (Intacto OS)
	Intactos provenientes de mães que consumiram ração padrão + azeite de oliva (Intacto AO)
	Separados provenientes de mães que consumiram ração padrão + óleo de soja (Separado OS)
	Separados provenientes de mães que consumiram ração padrão + azeite de oliva (Separado AO)
Fêmeas	Intactas provenientes de mães que consumiram ração padrão + óleo de soja (Intacto OS)
	Intactas provenientes de mães que consumiram ração padrão + azeite de oliva (Intacto AO)
	Separadas provenientes de mães que consumiram ração padrão + óleo de soja (Intacto OS)
	Separadas provenientes de mães que consumiram ração padrão + azeite de oliva (Intacto AO)

A partir do DPN 32 os animais passaram por tarefas comportamentais: campo aberto, consumo de alimentos palatáveis (corredor alimentar), consumo de alimentos palatáveis após exposição a novidades, consumo de alimentos palatáveis na caixa moradia do animal e claro/escuro. Nos DPN 52 e 53 os animais foram eutanasiados por decapitação, utilizando-se guilhotina, com posterior coleta das estruturas cerebrais (Figura 1).

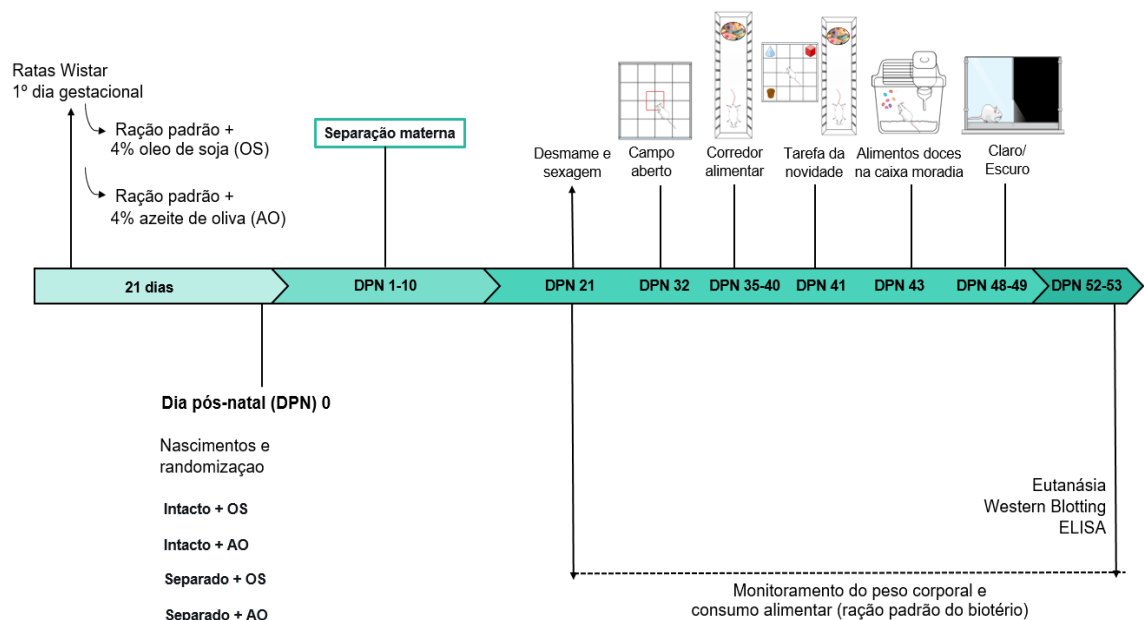


Figura 1. Linha do tempo do desenho experimental.

Todos os animais foram mantidos em suas caixas moradia em ciclos claro-escuro de 12h/12h, à temperatura constante de 22°C +/- 1°C com acesso a alimento e à água *ad libitum*.

4.3. Protocolo e composição das dietas

As dietas, padrão (contendo OS) e azeite (contendo AO), foram oferecidas desde o primeiro dia gestacional para as ratas prenhes até o dia desmame dos filhotes (DPN 21). A partir do desmame, os animais foram alimentados apenas com ração padrão fornecida pelo biotério (Nuvilab®).

Com relação à composição das dietas oferecidas no período gestacional/lactacional, ambas foram isocalóricas, oferecidas aos respectivos grupos experimentais e preparadas utilizando farelo da ração padrão fornecidas pelo biotério (Nuvilab®) acrescidas de 4% de OS ou 4% de AO (Qosa et al., 2015). Para maiores detalhes, a composição nutricional de ambas as dietas encontra-se na tabela 2 abaixo:

Quilocalorias (Kcal)	Gordura (g)	Carboidratos (g)	Proteínas (g)
325,2	7,8	42,5	21,1

A composição lipídica do OS pode ser encontrada na tabela suplementar 1 (Anexo B). A análise da composição de ácidos graxos presentes no AO utilizado está especificada abaixo na tabela 3.

Tabela 3. Ácidos graxos presentes no azeite de oliva (%)

Láurico C12:0	0,01
Mirístico C14:0	0,01
Palmítico C16:0	16,42
Palmitoleico C16:1	1,57
Heptadecanóico C17:0	0,06
Heptadecenóico C17:1	0,14
Estearico C18:0	2,72
Oleico C18:1 cis	63,43
Oleico C18:1 trans	4,03
Linoleico C18:2	9,09
Linolênico C18:3	0,78
Araquídico C20:0	0,70
Eicosenóico C20:1	0,67
Behênico C22:0	0,23
Lignocérico C24:0	0,14
Total saturado	20,29
Total monoinsaturados	69,84
Total poliinsaturados	13,12

4.4. Avaliação do consumo e peso corporal dos animais

Do dia do desmame até a eutanásia foram oferecidas quantidades previamente pesadas de ração padrão do biotério aos animais. A quantidade restante foi medida três vezes na semana para avaliar o consumo médio semanal. O consumo foi medido por caixa moradia e a quantidade de ração foi dividida pelo número de animais por caixa para determinar o consumo médio por animal. Para verificar a quantidade de quilocalorias (Kcal) consumidas por animal, a quantidade de ração ingerida foi multiplicada pelo conteúdo calórico por grama de comida 3,86 kcal/g. Uma vez que a partir do DPN 35 os animais estavam sob restrição alimentar, considerou-se apenas a avaliação do consumo até o DPN 34, bem como a avaliação do peso corporal.

O peso corporal, em gramas, foi medido semanalmente. Foi realizado o cálculo de ganho de peso através da seguinte fórmula: peso corporal da semana 2 – peso corporal da semana 1.

Para calcular a eficiência calórica dos animais foi utilizada a seguinte fórmula: ganho de peso em mg/consumo Kcal total.

4.5. Tarefas comportamentais no período da adolescência

Os grupos de animais foram submetidos às tarefas comportamentais no período da adolescência, a partir do DPN 32 até o DPN 49. Todas as tarefas comportamentais foram realizadas no ciclo escuro, ocorrendo das 19 às 23 horas.

4.5.1. Campo aberto

O teste do campo aberto representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação tanto da atividade motora como de comportamentos relacionados à ansiedade (Prut & Belzung, 2003). O aparato de campo aberto consiste de uma arena de madeira com assoalho preto (50 x 50 cm, altura 50 cm) que contém uma área central, aversiva para os ratos. Com o auxílio do programa de avaliação de imagens ANY-MAZE®, a locomoção central e periférica, a porcentagem de locomoção central em relação à locomoção total (locomoção periférica + locomoção central), o número de cruzamentos e a distância percorrida, foram avaliados durante os 10 minutos de exposição do animal ao aparato. Esta tarefa foi realizada no DPN 32 dos animais.

4.5.2. Consumo de alimentos palatáveis (Corredor alimentar)

Os animais foram colocados em uma extremidade de uma caixa retangular (40 x 15 x 20 cm) com piso e paredes laterais de madeira e teto de vidro. Dez unidades de Froot Loops® (Kellogg's® - pellets de trigo, amido de milho e sacarose) foram colocados na extremidade contrária da caixa ao que o animal foi posto. Os animais foram habituados a esse ambiente (fase de treinamento) por 5 dias por um período de 3 minutos por dia. Na fase de treinamento, os animais estavam sob restrição alimentar, recebendo 80% da ingestão habitual de ração padrão do biotério. 24 horas após a última sessão de treinamento, os animais foram alimentados *ad libitum* e expostos a uma sessão de teste de 3 minutos. Após o tempo de 3 minutos determinado para esta tarefa, nas sessões de treino e de teste, latência para chegar ao alimento palatável, latência para comer e o consumo (em gramas) do alimento palatável foram medidos (Silveira et al., 2004). Entre os animais, a caixa foi limpa com álcool etílico 30%. Já entre machos e fêmeas, a caixa foi limpa com álcool 70%. Tal tarefa foi realizada do DPN 35 até o DPN 40 dos animais.

4.5.3. Consumo de alimentos palatáveis após exposição a novidades

A fim de verificar se a exposição à novidade poderia afetar a ingestão de alimentos palatáveis, no dia posterior ao teste do corredor alimentar, DPN 41, os animais foram expostos por 5 minutos a uma caixa de madeira (50 x 50 cm, altura 50 cm) com vários objetos de plástico. Após este tempo, os animais passaram novamente pelo corredor alimentar e foram avaliados a latência para chegar ao alimento, a latência para comer e o consumo (em gramas) do alimento palatável Froot Loops® (Mineur et al., 2007). Os animais estavam com alimentação *ad libitum* nas últimas 24 horas.

4.5.4. Consumo de alimentos palatáveis na caixa moradia

No DPN 43, na própria caixa moradia dos animais, o consumo de 20 unidades de Froot Loops® foi avaliado. Enquanto um animal estava passando pelo teste, os outros animais pertencentes àquela mesma caixa permaneceram em uma caixa moradia nova (Lee et al., 2014, adaptado). Os animais estavam com alimentação *ad libitum* nas últimas 24 horas.

4.5.5. Claro/Escuro

O teste do claro-escuro consiste de uma caixa com dois compartimentos, um claro (aversivo) e um escuro (normalmente preferido). Este teste baseia-se no conflito do animal entre a exploração de um ambiente novo e a ansiedade associada à novidade, permitindo avaliar o seu comportamento tipo-ansioso (Slawewski, 2005). O animal foi colocado no compartimento claro do aparato podendo explorá-lo livremente por 5 minutos. Foram avaliadas a latência do animal para entrar no compartimento escuro, tempo total mantido no compartimento claro, número de entradas no claro, rearings no claro e postura de avaliação de risco (SAP, do inglês stretched-attend posture) na direção do outro compartimento. Os machos realizaram o teste no DPN 48 e as fêmeas, no DPN 49.

4.5.6. Avaliação do ciclo estral

Após a puberdade, as fêmeas iniciam o ciclo estral que consiste em uma flutuação hormonal com duração média de 4 a 5 dias. Foram seguidos critérios bem estabelecidos encontrados na literatura para determinação das fases (Freeman, 1994). Uma vez que, durante

a realização das tarefas comportamentais, ainda não havia ocorrido a abertura do canal vaginal de todas as fêmeas, a coleta de ciclo estral ocorreu apenas no dia da eutanásia.

O ciclo estral é caracterizado por períodos chamados metaestro, diestro, proestro e estro. O metaestro é caracterizado pela presença de leucócitos e ocasionais pequenos agrupamentos de células não-nucleadas queratinizadas. O diestro é caracterizado pela presença de leucócitos e células epiteliais nucleadas. O proestro apresenta aglomerados de células epiteliais nucleadas, ausência de leucócitos e ocasionais agrupamentos de células queratinizadas. O estro apresenta grande quantidade de células queratinizadas não-nucleadas. Para realizar o procedimento de avaliação do ciclo estral, as ratas foram retiradas da caixa-moradia e gentilmente manuseadas. Logo, 100µl de solução fisiológica (0,9%) foram gentilmente introduzidos, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, na entrada do canal vaginal do animal. A quantidade de solução dispensada dentro do canal vaginal foi recuperada por diferença de pressão na pipeta. A amostra foi colocada em lâmina de vidro e imediatamente analisada em microscópio óptico, para determinação da fase do ciclo estral.

4.5.7. Preparo dos homogenatos

Os animais foram rapidamente decapitados utilizando guilhotina e sem uso de anestesia, devido à realização de avaliação do imunoconteúdo de proteínas por Western Blotting. Justifica-se este tipo de procedimento pela necessidade de não interferir na liberação de neurotransmissores, evitando comprometer os resultados obtidos. Neste caso, o uso de doses anestésicas prévias à decapitação ou sobredosagem anestésica alteraria as propriedades intrínsecas e sinápticas das células neurais, tornando inviável as avaliações bioquímicas propostas.

4.6. Preparo das amostras

Para a técnica de Western Blotting, áreas encefálicas como núcleo accumbens, área tegmental ventral e córtex pré-frontal foram dissecadas e imediatamente congeladas -80°C para posterior utilização.

4.7. Avaliação do imunoconteúdo de proteínas por Western blotting

A detecção de proteínas nas amostras núcleo accumbens e área tegmental ventral foi realizada através de imunodeteção (Arcego et al., 2016). Foram utilizados anticorpos primários específicos para as proteínas: receptor 2 de dopamina (D2R), transportador de

dopamina (DAT), enzima tirosina hidroxilase (TH), além de CRH. Também foram utilizados anticorpos secundários específicos (anti-camundongo ou anti-coelho, conforme o anticorpo primário utilizado) ligados à peroxidase, os quais serão incubados com a proteína ligada ao anticorpo primário, na sequência. A imunorreatividade foi detectada pela emissão de luz por quimioluminescência (ECL - enhanced luminol-based chemiluminescent substrate), usando um detector de imagem digital (Image Quant LAS 4000 GE Healthcare Life Sciences). Os blots foram quantificados por análise de densitometria através do programa de análise de imagem *ImageJ software* (NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA).

4.8. Determinação de níveis de leptina, colesterol total, triglicerídeos e glicose por técnica de ELISA

Os níveis plasmáticos de leptina foram medidos usando kits de ensaio ELISA (leptina, Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante. Os níveis de glicose, colesterol total e triglicerídeos foram determinados por kits comerciais da Wiener Laboratorios (Rosario, Argentina). As amostras foram coletadas após jejum de 12 horas, centrifugadas a 3000 rpm, 4°C e durante 10 minutos para coleta apenas de plasma. Os resultados são apresentados em ng/mL.

4.9. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados através da análise de variância (ANOVA) de três vias utilizando sexo, separação materna e dieta como fatores. Para os resultados de consumo calórico e peso corporal foi utilizado ANOVA de medidas repetidas e a correção de *Greenhouse-Greisser* foi aplicada quando necessário (considerando a violação da suposição de esfericidade, como mostra o teste de Mauchly). Todas as análises foram realizadas com o software SPSS 22.0 e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados sobre consumo alimentar e peso corporal

O consumo alimentar aumentou com o passar do tempo ($F [1,40] = 77,51$, $p < 0,001$, correção para Greenhouse-Geisser; Figura 2A). Com relação ao peso corporal, houve uma interação entre os fatores (tempo x sexo x SM), indicando que ratas fêmeas separadas apresentaram aumento do peso corporal ao longo do tempo ($F [1,64] = 7,37$, $p = 0,009$, correção para Greenhouse-Geisser; Figura 2B). Houve uma interação entre os fatores (sexo x SM) em relação ao ganho de peso, demonstrando que ratas fêmeas que passaram pela SM tiveram maior ganho de peso ($F [1,64] = 7,37$, $p = 0,009$; Figura 2C). Quando avaliada a eficiência calórica, foi observado um efeito da SM, animais separados apresentaram uma maior eficiência calórica ($F [1,64] = 6,04$, $p = 0,017$, Figura 2D).

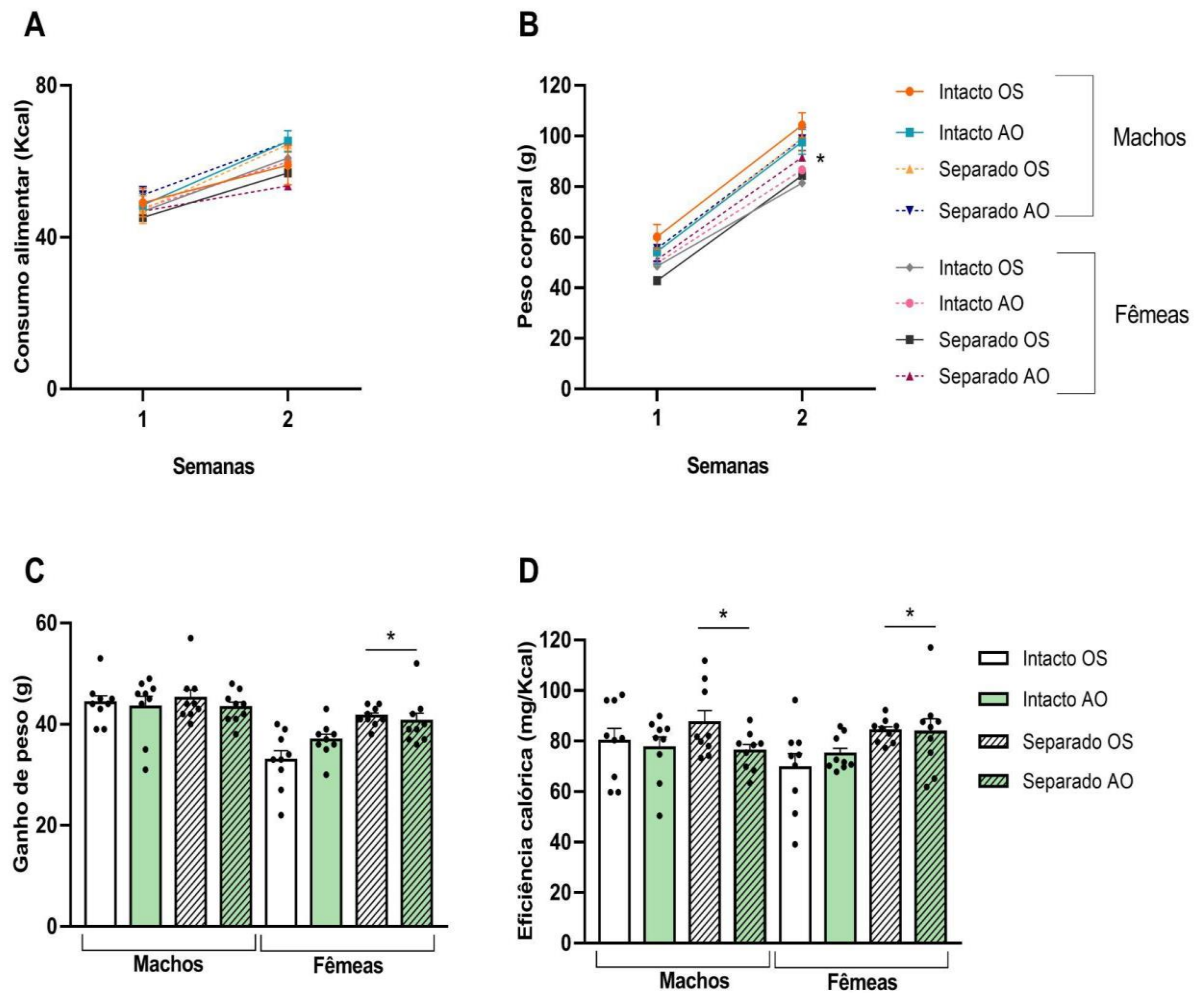


Figura 2: Efeitos do consumo de azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o consumo, peso corporal, ganho de peso e eficiência calórica da prole adolescente (machos e fêmeas) submetida à separação materna no início da vida. **A)** Consumo calórico em semanas do desmame até o início dos testes de comportamentos (entre os dias pós-natal 21-34), $n=6$ /grupo (por caixa moradia de animais, com 3-5 animais/caixa). **B)** Peso corporal durante 2 semanas, $n=9$ /grupo. ANOVA de medidas repetidas demonstrou que todos os animais aumentaram o consumo ao longo do tempo. Com relação ao peso corporal, houve uma interação entre os fatores (tempo x sexo x SM), indicando que os animais aumentaram o peso corporal ao longo tempo, sendo que os ratos fêmeas submetidas à SM apresentaram maior peso corporal. **C)** Ganho de peso, $n=9$ /grupo. **D)** Eficiência calórica, $n=9$ /grupo. ANOVA de três vias mostrou uma interação entre os fatores (sexo x SM) demonstrando que ratas fêmeas separadas tiveram um maior ganho de peso. Foi visto um efeito da SM na eficiência calórica, apontando que os animais separados apresentaram uma maior eficiência calórica. Dados expressos como média \pm EPM, * $p<0,05$. Kcal: quilocaloria, g: gramas, mg: miligramas.

5.2. Níveis plasmáticos de leptina, glicose, colesterol total e triglicerídeos durante o período da adolescência

Uma interação entre sexo, SM e dieta foi identificada nos níveis plasmáticos de leptina ($F [1,40] = 4,91, p = 0,032$), sugerindo que as fêmeas que passaram por SM aumentaram os níveis plasmáticos de leptina mas o consumo de AO durante a gestação e lactação foi capaz de atenuar esse aumento. Esses efeitos foram contrários aos ratos machos. Em relação aos níveis de triglicerídeos, foi observado um efeito principal da dieta ($F [1,39] = 4,64, p = 0,037$), com menores níveis nos animais provenientes de mães que consumiram AO. Quanto aos níveis de glicose e colesterol, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis plasmáticos de leptina, glicose, colesterol total e triglicerídeos

Sexo		Grupo			
		Intactos		Separados	
		OS	AO	OS	AO
Machos	Leptina	123,71 ± 9,64	89,90 ± 4,41	93,71 ± 3,30	106,57 ± 5,65
	Glicose	70,49 ± 4,44	83,01 ± 8,87	71,39 ± 8,38	75,56 ± 6,21
	Colesterol total	47,26 ± 3,89	54,76 ± 4,02	60,59 ± 5,37	43,14 ± 5,82
	Triglicerídeos	55,11 ± 5,20	58,90 ± 9,75*	83,43 ± 11,95	44,72 ± 4,79*
Fêmeas	Leptina	106,31 ± 9,03	110,86 ± 20,56	152,02 ± 11,36	122,62 ± 23,11‡
	Glicose	84,28 ± 4,69	85,16 ± 6,09	72,29 ± 1,71	86,83 ± 4,85
	Colesterol total	51,38 ± 6,49	50,47 ± 3,22	53,65 ± 3,79	52,81 ± 2,55
	Triglicerídeos	55,46 ± 9,89	48,22 ± 9,37	62,00 ± 6,25	53,71 ± 7,54

Tabela 4. Níveis plasmáticos de leptina, glicose, colesterol total e triglicerídeos de animais no período da adolescência. OS, óleo de soja; AO, azeite de oliva. ANOVA de três vias indicou uma interação entre sexo, SM e dieta ($p = 0,032$), demonstrando que fêmeas separadas e provenientes de mães alimentadas com AO apresentaram maiores níveis plasmáticos de leptina. Um efeito da dieta ($p = 0,037$) foi visto nos níveis de triglicerídeos, retratando que animais provenientes de mães que consumiram AO apresentaram menores níveis de triglicerídeos. Dados expressos como média ± EPM, $n = 6$ / grupo. *efeito da dieta, ‡ interação (sexo x SM x dieta).

5.3. Resultados das tarefas de campo aberto e claro/escuro

A atividade locomotora foi avaliada através do número de cruzamentos realizados na tarefa do campo aberto por um período de 10 minutos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação à atividade locomotora dos animais (Figura 3A). O comportamento tipo ansioso foi avaliado pela tarefa de claro/escuro. Em relação ao número de entradas na área clara, foi encontrado um efeito do sexo, onde fêmeas entraram mais vezes no compartimento claro ($F [1,64] = 4,00, p = 0,05$, Figura 3C). Também houve um efeito da dieta, onde animais

provenientes de mães alimentadas com AO entraram menos vezes no compartimento claro ($F [1,64] = 4,41, p = 0,04$, Figura 3C). Com relação ao número de comportamentos de exploração (*rearings*) no compartimento claro, ocorreu uma interação entre os fatores (SM x dieta), onde animais provenientes de mães alimentadas com AO e que passaram por SM diminuíram a atividade exploratória ($F [1,64] = 4,72, p = 0,033$, Figura 3E).

Não foram encontradas diferenças significativas nos seguintes parâmetros: latência para entrar no compartimento escuro, tempo de permanência no compartimento claro e comportamento de avaliação de risco ($p > 0,05$, Figuras 3B, D, F).

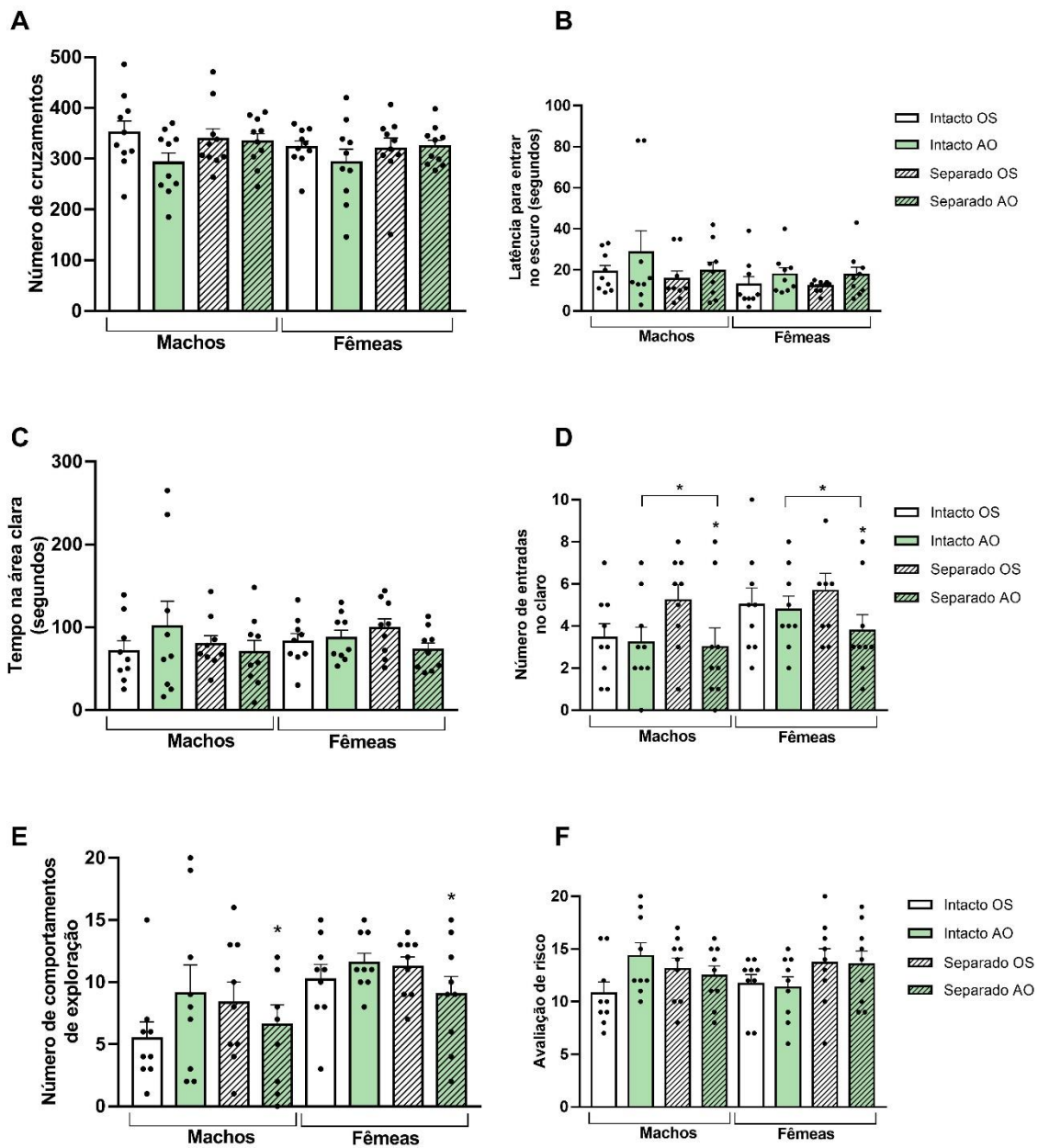


Figura 3. Efeitos do consumo de azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o comportamento da prole adolescente (machos e fêmeas) submetida à separação materna no início da vida. **A)** Número de cruzamentos no teste de campo aberto. **B)** Latência para entrar no compartimento escuro no teste de claro/escuro. **C)** Tempo permanecido na área clara no teste de claro/escuro. **D)** Número de entradas no compartimento claro no teste de claro/escuro. **E)** Número de comportamentos de exploração. **F)** Avaliação de risco. ANOVA de três vias mostrou um efeito do sexo no número de entradas no compartimento claro no teste de claro/escuro (fêmeas entraram mais vezes no compartimento claro), um efeito da dieta (animais provenientes de mães que consumiram AO entraram menos vezes no compartimento claro), uma interação entre SM X dieta no número de rearings (animais separados provenientes de mães que consumiram AO fizeram menor número de rearings), nenhum efeito foi encontrado nos parâmetros de avaliação de risco, latência para entrar no compartimento escuro e tempo permanecido no claro. Dados expressos como média \pm EPM, n= 10/ grupo (campo aberto), n=9/grupo (claro/escuro). *p<0,05.

5.4. Resultados sobre corredor alimentar/ busca de alimentos palatáveis

Na tarefa do corredor alimentar, avalia-se a latência para chegar ao alimento palatável, a latência para comer o alimento e o consumo (em gramas) do alimento palatável (*Froot Loops*®). Na sessão de treino, os animais estavam sob restrição alimentar de 80%. Com o passar dos dias, machos e fêmeas chegaram mais rapidamente ao alimento palatável ($F [1,44] = 3,85$, $p = 0,038$, correção para Greenhouse-Geisser; Figuras 4A, B). Animais que passaram pela SM apresentaram uma menor latência para comer ($F [3,57] = 2,51$, $p = 0,049$, correção para Greenhouse-Geisser; Figuras 4C, D) e aumentaram o consumo de *Froot Loops*® ($F [3,25] = 6,42$, $p < 0,001$, correção para Greenhouse-Geisser; Figuras 4E, F).

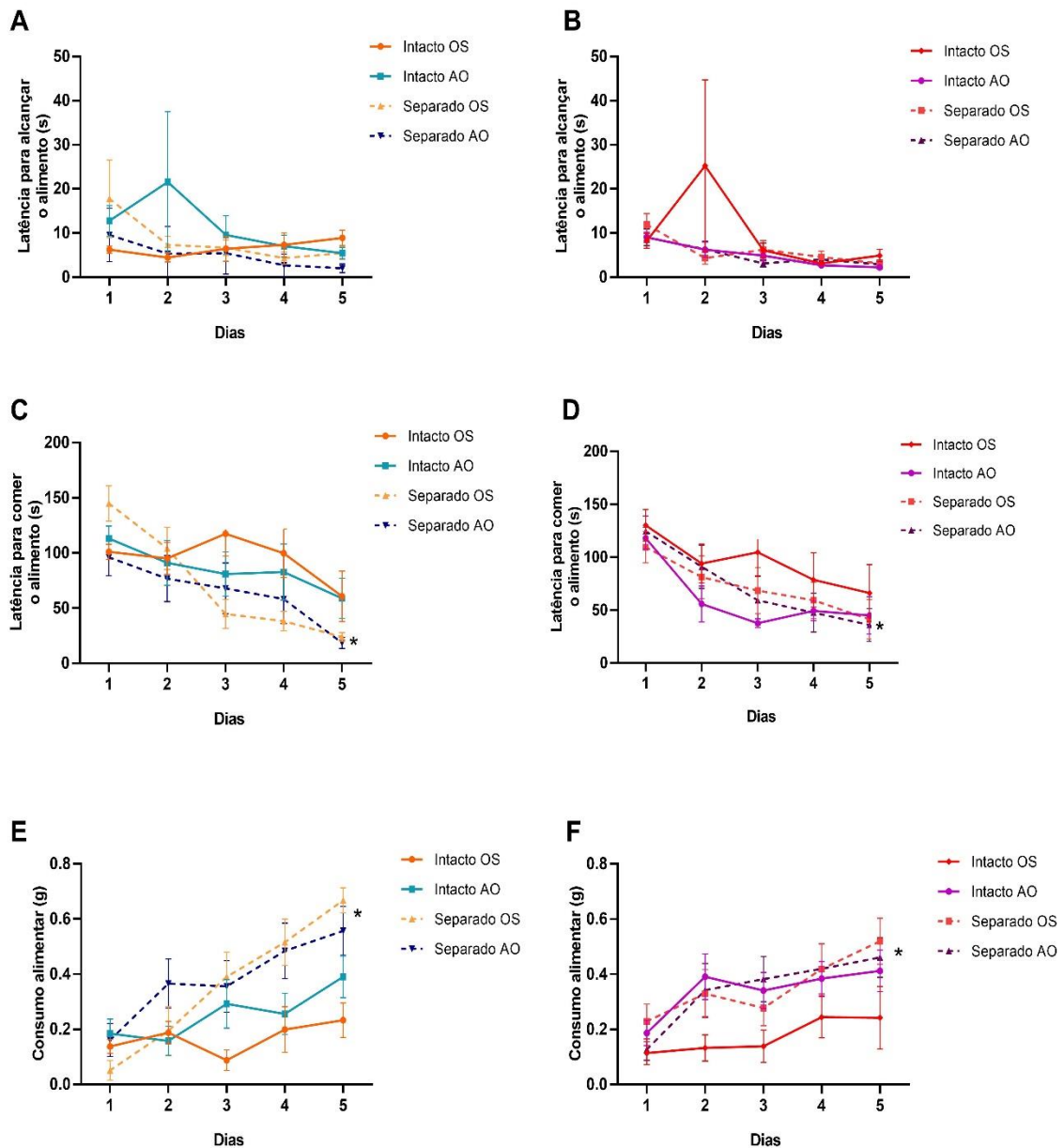


Figura 4. Avaliação da tarefa de busca de alimentos palatáveis na sessão de treinamento, quando oferecidos Froot Loops®. **A)** Latência dos machos para chegar ao alimento palatável durante o treinamento (animais com restrição alimentar de 80%). **B)** Latência das fêmeas para chegar ao alimento palatável durante o treinamento. **C)** Latência dos machos para começar a comer durante o treinamento. **D)** Latência das fêmeas para começar a comer durante o treinamento. **E)** Quantidade consumida pelos machos durante o treinamento. **F)** Quantidade consumida pelas fêmeas durante o treinamento. ANOVA de três vias mostrou um efeito do tempo na latência para alcançar o alimento palatável ($p = 0,038$), uma interação entre tempo x SM na latência para iniciar a alimentação ($p = 0,049$) e na quantidade consumida ($p < 0,001$). Dados expressos como média \pm EPM, $n = 9$ / grupo. * $p < 0,05$.

No dia do teste, quando os animais foram alimentados *ad libitum* nas últimas 24 horas, animais provenientes de mães que consumiram AO apresentaram uma maior latência para chegar ao alimento palatável ($F [1,64] = 4,55, p = 0,037$, Figura 5A). Foi observada uma interação significativa entre SM e dieta na latência para comer o alimento ($F [1,64] = 13,43, p = 0,001$, Figura 5B) e no consumo ($F [1,64] = 4,39, p = 0,04$, Figura 5C), uma vez que ambos os fatores aumentaram o consumo mas o efeito da interação não foi somatório.

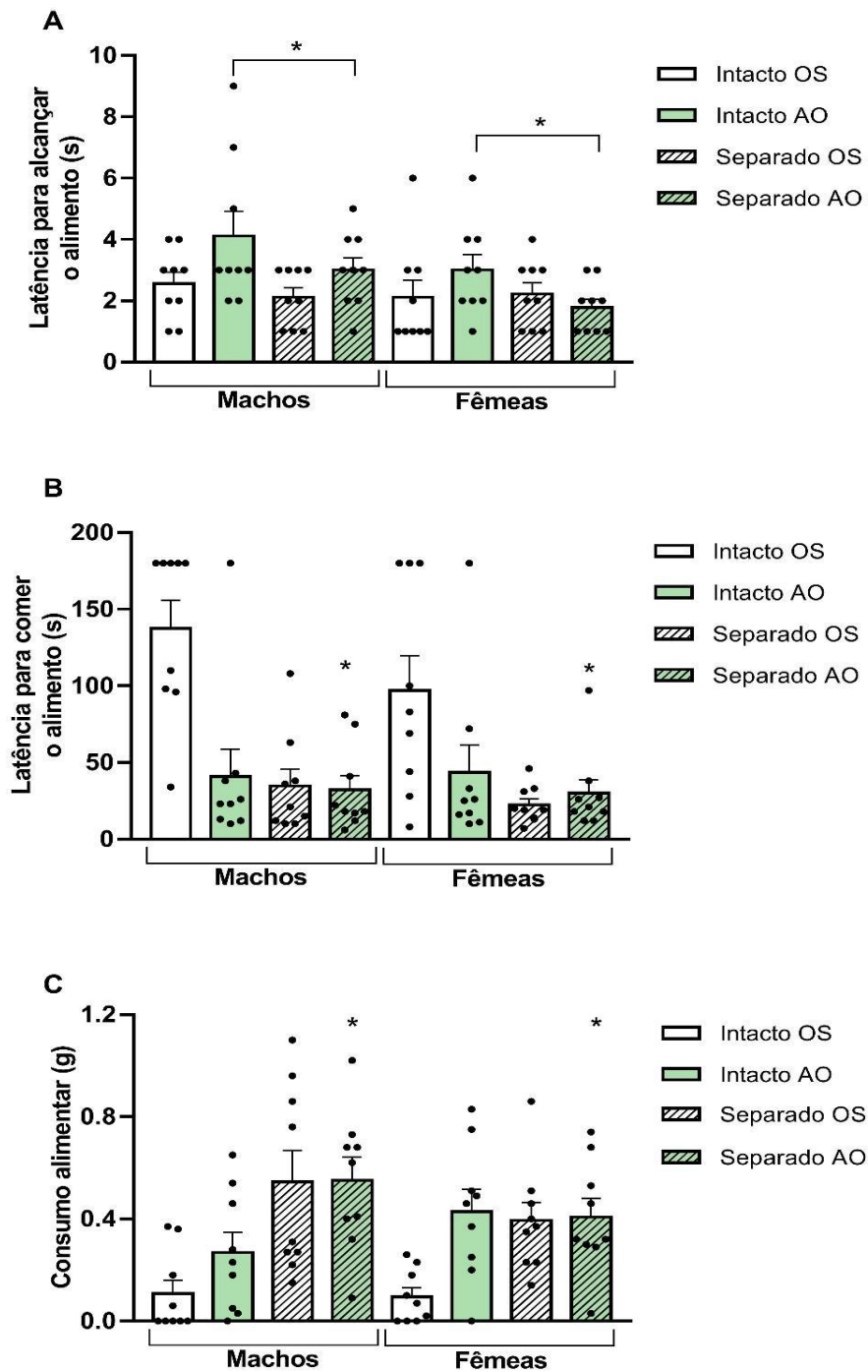


Figura 5. Avaliação da tarefa de busca de alimentos palatáveis na sessão de teste quando oferecidos Froot Loops®. **A)** Latência para chegar ao alimento palatável no teste (animais alimentados *ad libitum*). **B)** Latência para começar a comer no teste. **C)** Quantidade consumida no teste. ANOVA de três vias mostrou um efeito da dieta na latência para chegar ao alimento palatável ($p = 0,037$), uma interação entre SM e dieta na latência para comer o alimento ($p = 0,001$) e no consumo ($p = 0,04$). Dados expressos como média \pm EPM, $n = 9$ / grupo. * $p < 0,05$.

5.5. Resultados sobre tarefa da novidade e consumo de alimentos doces na caixa moradia

Os animais separados e provenientes de mães alimentadas com AO apresentaram latências maiores para chegar até o alimento doce, quando comparados aos outros grupos ($F [1,64] = 8,42$, $p = 0,005$, Figura 6A). Os animais separados apresentaram menores latências para comer ($F [1,64] = 14,64$, $p < 0,001$, Figura 6B), bem como consumiram mais o alimento palatável após exposição à novidade ($F [1,64] = 23,60$ $p < 0,001$, Figura 6C). Além disso, foi visto um efeito da dieta para comer o alimento doce ($F [1,64] = 3,98$, $p = 0,05$, Figura 6B) e também no consumo ($F [1,64] = 5,61$, $p = 0,021$, Figura 6C), sendo demonstrado que animais AO consumiram mais os alimentos palatáveis bem como apresentaram menores latências para chegar até eles.

O consumo de Froot Loops® também foi investigado na caixa moradia dos animais. Todos os animais estavam alimentados *ad libitum* nas últimas 24 horas. Os animais separados consumiram mais o alimento doce ($F [1,64] = 5,01$, $p = 0,029$, Figura 6D).

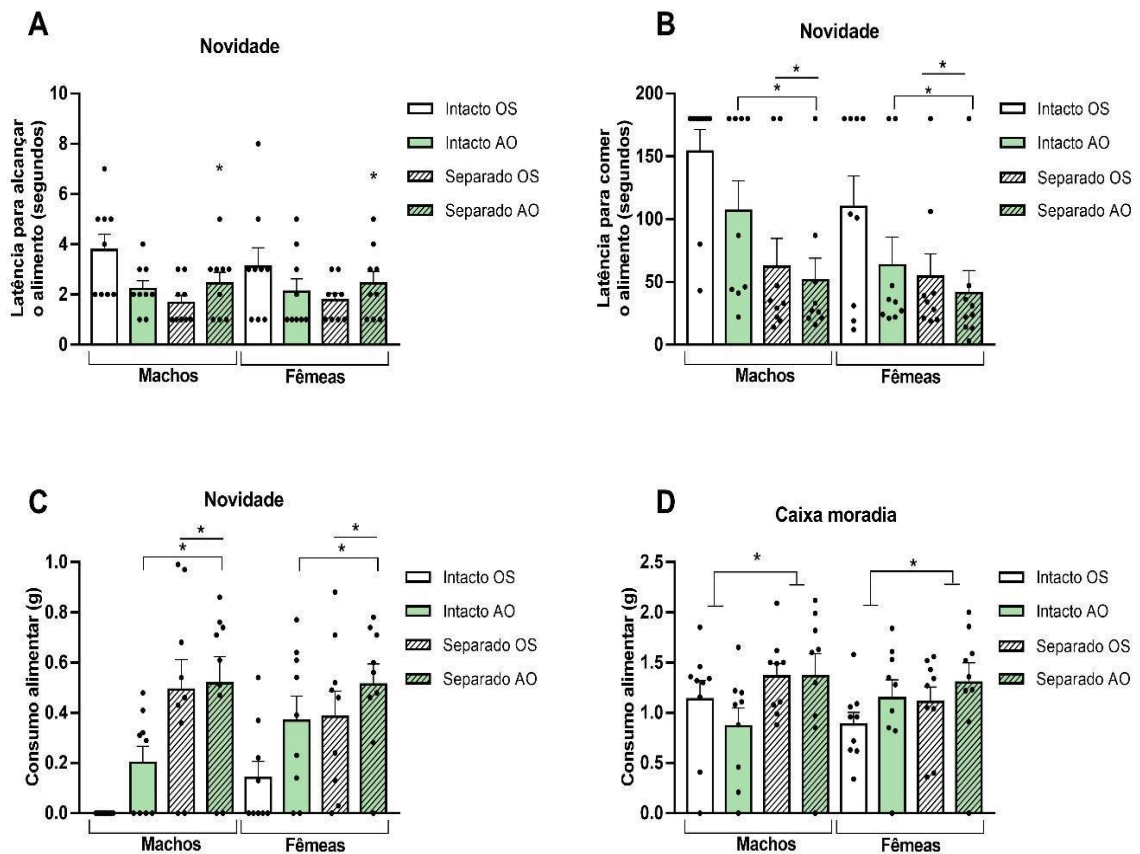


Figura 6. Avaliação da tarefa de exposição a novidades e posterior consumo de Froot Loops® e do consumo de alimento palatável na caixa moradia do roedor. **A)** Latência para chegar ao alimento palatável após a exposição à novidade. **B)** Latência para comer o alimento palatável. **C)** Quantidade consumida após a exposição à novidade. **D)** Consumo de alimento palatável na caixa moradia do animal (avaliação de um animal por vez). ANOVA de três vias mostrou uma interação entre SM x dieta na latência para chegar ao alimento palatável após exposição a novidade (animais separados provenientes de mães alimentadas com AO tiveram uma maior latência para chegar ao alimento palatável), um efeito da SM na latência para comer o alimento após a exposição a novidade (animais separados apresentaram menor latência para comer) e um efeito da dieta para comer após a exposição a novidade (animais provenientes de mães alimentadas com AO apresentaram menor latência para comer), um efeito da SM na quantidade consumida de alimento palatável após a exposição a novidade (animais separados consumiram mais) e um efeito da dieta no consumo após a exposição a novidade (animais provenientes de mães alimentadas com AO consumiram mais o alimento palatável). Dados expressos como média ± EPM, n= 9/ grupo. *p<0,05.

5.6. Resultados Western Blotting

A análise do imunocontéudo do receptor D2 no núcleo accumbens indicou uma interação entre dois fatores (SM X dieta). Os animais separados reduziram o imunocontéudo de D2R, mas o consumo de AO preveniu os efeitos causados pela SM ($F [1,24] = 5,94, p = 0,023,$

Figura 7A). No entanto, não houve diferenças significativas observadas no imunoconteúdo de transportador de dopamina (DAT, Figura 7B) e da enzima tirosina hidroxilase (TH, Figura 7C), ($p > 0,05$).

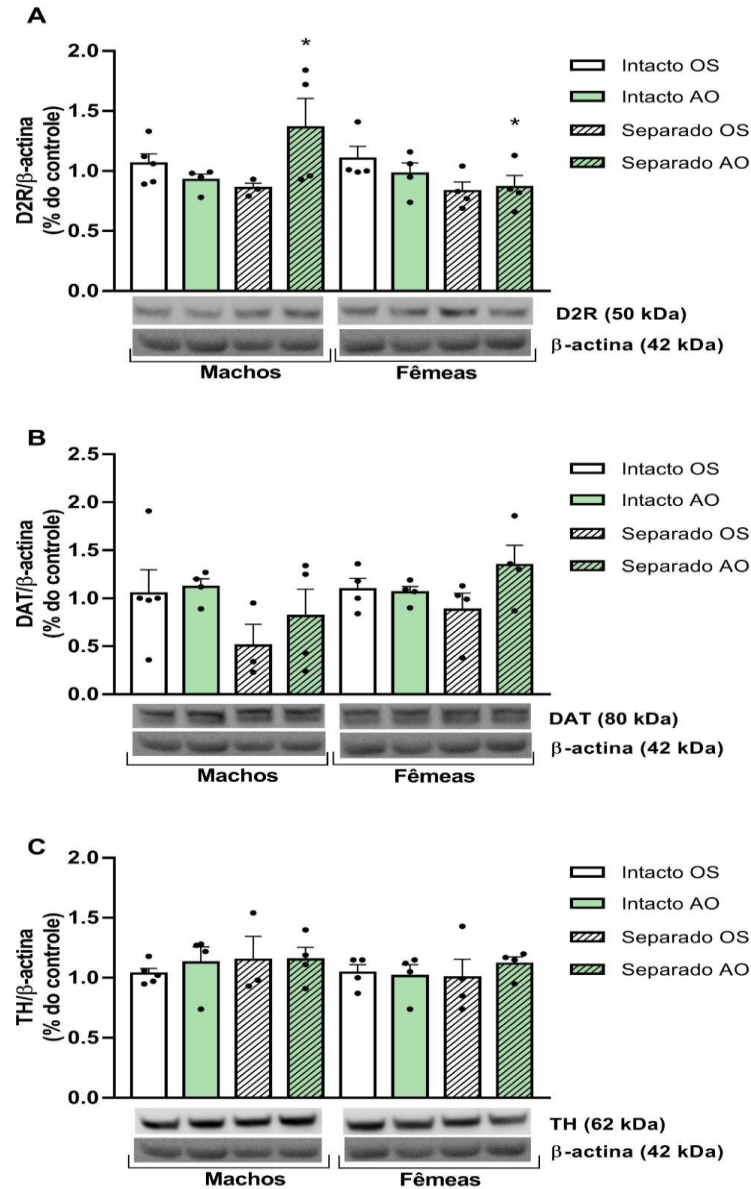


Figura 7. Efeitos do consumo de azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a sinalização dopaminérgica no núcleo accumbens da prole adolescente (machos e fêmeas) submetida à separação materna no início da vida. **A)** D2R, $n = 3-5$ /grupo. **B)** DAT, $n = 3-5$ /grupo. **C)** TH, $n = 3-5$ /grupo. ANOVA de três vias demonstrou uma interação entre SM x dieta na análise de D2R, ratos separados provenientes de mães alimentadas com AO preveniram a redução no imunoconteúdo do receptor causada pela SM. Dados expressos como média \pm EPM, $n = 3-5$ / grupo. * $p < 0,05$.

A análise do imunocontéudo do CRHR1 na ATV indicou uma interação entre os fatores (sexo x SM x dieta). Os resultados indicaram que ratas fêmeas separadas diminuíram o imunocontéudo de CRHR1 na ATV, mas o consumo de AO foi capaz de prevenir essa redução. Já o contrário foi visto em machos separados AO (F [1,25] = 5,43, p = 0,28, Figura 8A). Em relação ao imunocontéudo do receptor CRHR2, não foram encontradas diferenças entre os grupos (p > 0,05, Figura 8B). Quanto a análise do imunocontéudo da enzima TH foi encontrado um efeito do sexo, onde fêmeas apresentaram um maior imunocontéudo desta proteína na área tegmental ventral (F [1,25] = 15,34, p = 0,001, Figura 8C).

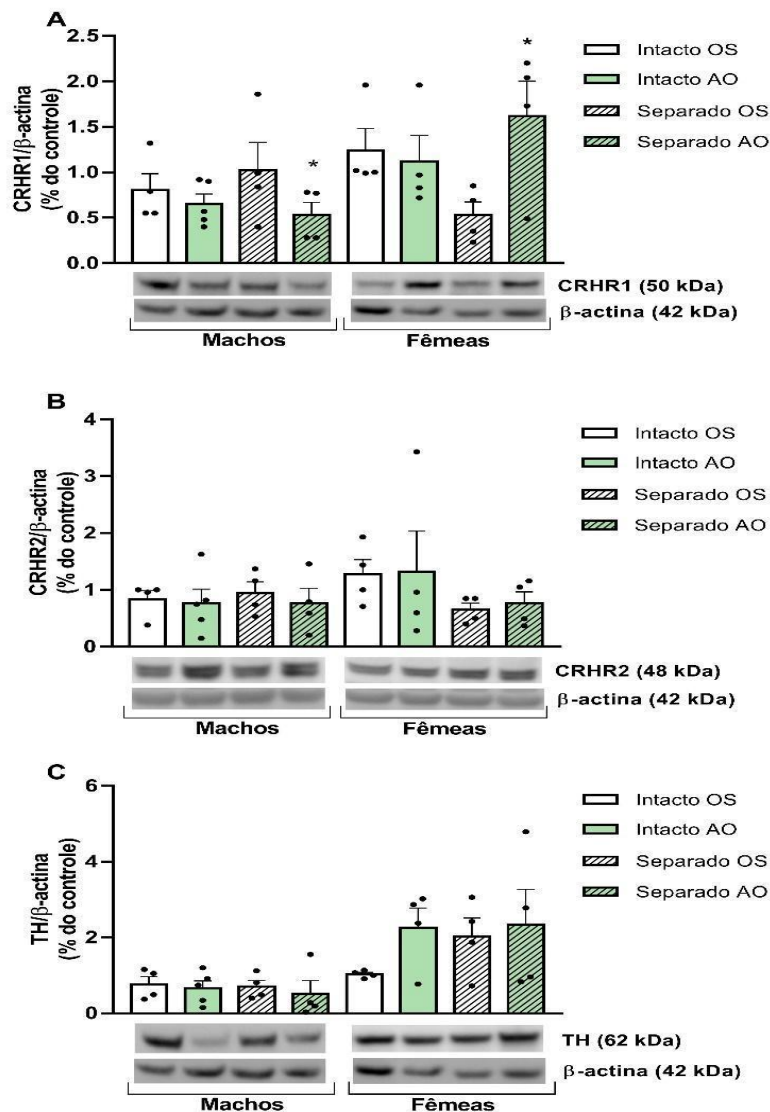


Figura 8. Efeitos do consumo de azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o imunoccontéudo de proteínas como CRHR1, CRHR2 e TH na área tegmental ventral da prole adolescente (machos e fêmeas) submetida à separação materna no início da vida. **A)** CRHR1, n= 4-5/grupo. **B)** CRHR2, n= 4-5/grupo. **C)** TH, n= 4-5/grupo. ANOVA de três vias demonstrou uma interação entre sexo x SM x dieta na análise de CRHR1, demonstrando que fêmeas separadas AO apresentaram um maior imunoccontéudo desta proteína e o contrário

foi visto em machos do mesmo grupo. Houve um efeito do sexo na análise de TH, indicando que as fêmeas apresentaram maior imunocnteúdo desta proteína. Dados expressos como média \pm EPM, n= 4-5/ grupo. *p<0,05.

5.7. Avaliação do ciclo estral

Durante a realização dos testes comportamentais foi acompanhada a abertura do canal vaginal das fêmeas, entretanto somente no dia da eutanásia (DPN 53) foi possível realizar o lavado vaginal de todas as fêmeas para observar as fases do ciclo estral. A distribuição das fases do ciclo estral neste dia está representada na Figura 9, sendo visto que a maioria das fêmeas estava na fase diestro do ciclo estral.

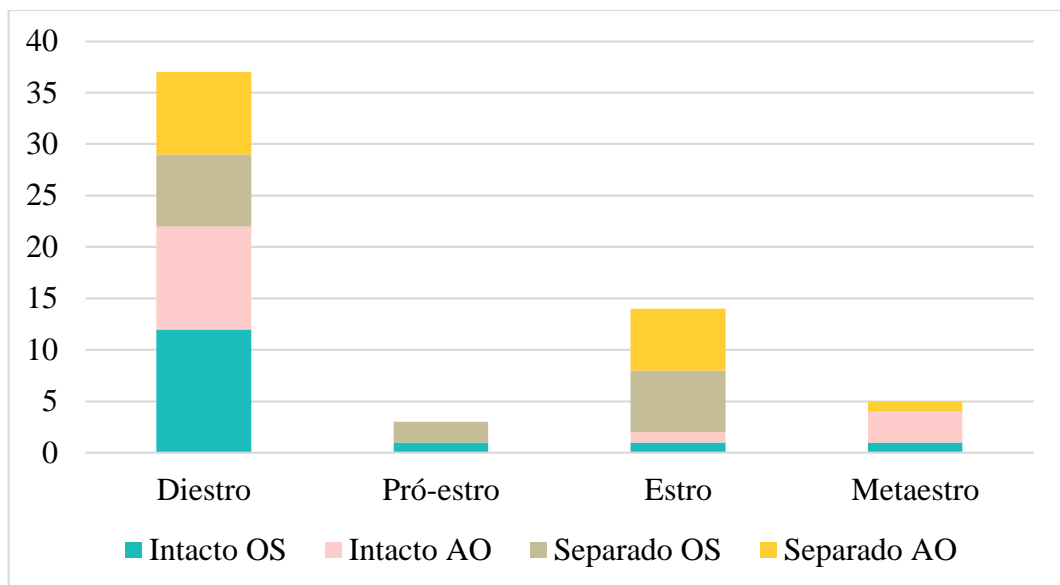


Figura 9. Distribuição das fases do ciclo estral no dia da eutanásia.

PARTE III

6. DISCUSSÃO

A influência do ambiente durante a gestação e a primeira infância dos roedores pode programar o metabolismo e comportamento dos animais ao longo da vida. O nosso estudo analisou como a nutrição materna poderia impactar o metabolismo e o comportamento alimentar da prole na adolescência, submetida a um evento estressor no início da vida. Nossos principais achados mostraram que a separação materna, aumentou o ganho de peso e a eficiência calórica, especialmente nas fêmeas. Quando os animais foram expostos a um ambiente novo (corredor alimentar) para consumir um alimento diferente e rico em açúcar simples, os resultados indicaram que os animais de ambos os sexos, submetidos à SM e provenientes de mães que consumiram azeite de oliva aumentaram o consumo do alimento novo e palatável. No entanto, a interação dos fatores não mostrou um efeito somatório sobre o consumo. Interessante que após a novidade (uma caixa com brinquedos) os animais provenientes de mães que consumiram azeite de oliva e os animais submetidos à separação materna consumiram mais alimento palatável. Além disso, quando avaliamos o consumo de alimento doce na caixa moradia, os animais separados de ambos os sexos, aumentaram o consumo de alimento doce. Com relação aos achados bioquímicos, nós verificamos diferenças com relação ao sexo. As fêmeas separadas aumentaram os níveis plasmáticos de triglicerídeos e leptina, e reduziram o imunoconteúdo de CRHR1 na área tegmentar ventral. Todos esses efeitos foram prevenidos pelo azeite de oliva. Já os machos aumentaram os níveis plasmáticos de triglicerídeos, diminuíram os níveis de leptina e aumentaram o imunoconteúdo de CRHR1 na área tegmentar ventral. Da mesma forma, o consumo de azeite de oliva preveniu os efeitos. Em ambos os sexos, a separação reduziu o imunoconteúdo do receptor D2R no núcleo accumbens, mas essa redução foi prevenida pelo consumo de azeite de oliva.

A ruptura da ligação mãe-filhote pode induzir uma programação neuroendócrina, modulando a resposta hormonal e induzindo alterações metabólicas nos animais. No nosso estudo, o controle homeostático da alimentação é distintamente controlado por machos e fêmeas. Nossos achados mostraram que a separação materna apesar de não ter alterado o consumo calórico das dietas oferecidas na caixa-moradia, induziu um aumento no ganho de peso e na eficiência calórica, especialmente nas fêmeas adolescentes. Esses resultados sugerem que as fêmeas convertem mais as calorias consumidas em ganho peso corporal em relação aos machos. Outros estudos também mostraram que fêmeas separadas ganharam mais peso e apresentam maior depósito de gordura visceral sem alterar o consumo de ração padrão (Gehrand

et al., 2016; Jaimes-Hoy et al., 2016; Raff et al., 2018). Além disso, também foi verificada aparentemente maior eficiência calórica, sugerindo que as fêmeas apresentam maior capacidade para manter suas reservas energéticas (Jaimes-Hoy et al., 2016; Mauvais-Jarvis, 2015). É possível que machos e fêmeas apresentem um distinto metabolismo basal. Com relação aos níveis plasmáticos de leptina, nós observamos que machos separados diminuíram os níveis de leptina, enquanto que as fêmeas separadas aumentaram os níveis de leptina. Em ambas as situações o azeite de oliva atuou no sentido oposto (aumentando nos machos e reduzindo nas fêmeas) no plasma dos animais. Esse resultado sugere que o estresse no início da vida pode influenciar de outra forma a atividade do metabolismo basal dependendo do sexo. Yam e colaboradores (2017) mostraram que a separação materna aumentou a expressão da proteína desacopladora (UCP1) no tecido adiposo branco inguinal, e diminuiu a massa do tecido adiposo, os níveis plasmáticos de leptina e a expressão da leptina no tecido adiposo dos animais (Yam et al., 2017). No nosso estudo, os machos separados também apresentaram menor ganho de peso e diminuição nos níveis plasmáticos de leptina. Já nas fêmeas separadas foi observado maior ganho de peso, maior eficiência calórica e maiores níveis plasmáticos de leptina, sugerindo mecanismos opostos para o controle homeostático alimentar. Nós podemos especular que a exposição ao estresse nos machos possa afetar parâmetros do tecido adiposo enquanto que as fêmeas possam apresentar alterações na expressão gênica da leptina ou do seu receptor assim como, em moléculas sinalizadoras dos seus efeitos.

Na tentativa de verificar o comportamento alimentar hedônico na adolescência dos animais submetidos à nutrição materna e ao estresse no início da vida, nós realizamos a tarefa do corredor alimentar. Nós observamos que os animais separados de ambos os sexos, aumentaram o consumo de alimento doce nas sessões de treino e teste. Outros estudos reforçam os nossos achados, indicando que a separação materna aumenta a preferência pela ingestão de alimentos doces (Chocyk et al., 2015; Ferreira et al., 2013). Nós também observamos que os animais provenientes de mães que consumiram azeite de oliva na gestação, aumentam o consumo de alimento palatável na adolescência. É possível que os efeitos observados nos grupos azeite de oliva possam estar envolvidos com a palatabilidade desse alimento. Os roedores preferem óleos e gorduras por causa da estimulação olfativa (odor), textura e efeitos pós-digestivos. Dessa forma, o sabor do óleo pode contribuir para os efeitos recompensadores, aumentando a liberação de dopamina pelo núcleo accumbens (Liang et al., 2006; Takeda et al., 2001). Além disso, nós verificamos uma interação entre separação materna e azeite de oliva aumentando o consumo, mas esses efeitos não foram somatórios. Esses resultados sugerem que

o ambiente pode estar atuando como moderador desse efeito, de modo que, dependendo de como foi o ambiente no início da vida dos animais, o efeito do azeite de oliva será diferente.

Um achado interessante do nosso estudo foi relacionado também com a tarefa do corredor alimentar. Nós observamos que os animais de ambos os sexos, separados e os provenientes de mães que consumiram azeite de oliva, aumentaram o consumo de alimentos doces. No entanto, quando avaliamos o consumo de alimento doce na caixa moradia dos animais, apenas os animais separados, de ambos os sexos, aumentaram o consumo. Os resultados obtidos sugerem que os animais separados no início da vida, independente de estarem em um ambiente novo ou conhecido consomem mais alimentos doces mesmo estando saciados. Com relação ao aumento no consumo induzido pelo azeite de oliva, é possível especular alguns possíveis fatores que podem estar envolvidos no comportamento alimentar hedônico. A tarefa da novidade pode ter induzido ansiedade nos animais e, por apresentar esse comportamento, os animais consumiram mais alimento doce. Para excluir que esses animais pudessem apresentar um comportamento do tipo ansioso, foi realizada a tarefa do claro-escuro. Nós observamos apenas que os animais azeite de oliva reduziram as entradas no claro e reduziram a atividade exploratória dos animais estressados de ambos os sexos. Esses achados podem indicar que os animais azeite de oliva são mais vulneráveis a desenvolver um comportamento do tipo ansioso. Assim, é possível que a tarefa da novidade tenha reforçado esse comportamento nos animais e eles tenham consumido mais alimentos doces em resposta à ansiedade. Essa especulação é reforçada, pois quando esses animais foram expostos ao alimento doce em um ambiente conhecido, não houve efeito sobre o consumo nos animais azeite de oliva.

No entanto, os achados relacionados ao comportamento alimentar foram intrigantes e nos conduziram a pensar que possivelmente os fatores ambientais possam estar envolvidos com diferentes controles sobre o comportamento alimentar hedônico. O alimento doce é uma recompensa natural e os sistemas de recompensa são sensíveis a fatores ambientais, principalmente em fases precoces do desenvolvimento. Além disso, o circuito de recompensa é associado a distintas respostas. A saliência do incentivo está relacionada ao valor motivacional da recompensa (“querer”), enquanto a reação hedônica está associada ao prazer da recompensa (“gostar”) (Berridge, 2009). Essas respostas são mediadas por processos distintos na neurotransmissão de motivação e recompensa, entretanto, ambas são necessárias para o processo normal da recompensa. As respostas relacionadas ao querer o alimento doce estão envolvidas com projeções de neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral para o núcleo accumbens. Já o sistema opióide e canabinoide parecem estar mais envolvidos com o gostar.

Esses sistemas ativados estimulam o apetite por gostar de ingerir o alimento, sugerindo uma resposta associada a palatabilidade do mesmo (Jarrett et al., 2005; Kelley et al., 2002; Peciña & Smith, 2010; Niki, Jyotaki, Yoshida, & Ninomiya, 2011). É possível que as diferenças observadas com relação a dieta contendo azeite de oliva possa estar envolvida com a palatabilidade desse alimento. Sendo assim, os efeitos observados pelo azeite de oliva sobre o consumo de alimento doce pode estar envolvido com circuitos de recompensa que envolve o sistema opióide ou canabinóide.

No intuito de esclarecer essa dúvida, nós investigamos o imunocontéudo de proteínas envolvidas com a sinalização dopaminérgica no núcleo accumbens e área tegmentar ventral dos animais adolescentes. Os resultados mostraram que os animais separados, de ambos os sexos, diminuíram o imunocontéudo de D2R no núcleo accumbens, mas esse efeito foi contrário na presença de azeite de oliva. Alguns estudos reforçam os nossos achados, indicando que o aumento do consumo de alimentos doces pode estar relacionado com a diminuição do imunocontéudo do receptor do tipo D2R no núcleo accumbens (Lampert et al., 2017; Majcher-Maślanka et al., 2017), sugerindo uma baixa inibição da sinalização retrógrada mediada pelos receptores D2. Esses auto-receptores regulam a atividade da dopamina por diminuir a liberação vesicular através da inibição da síntese de dopamina e sua exocitose (Schmitz et al., 2001; Yorgason et al., 2013). Além disso, uma redução nos receptores D2 no estriado tem sido associado com a ingestão de drogas e alimentos (Baik, 2013; Machado et al., 2013; Murray et al., 2014). Nós também observamos um efeito do sexo no imunocontéudo da enzima tirosina hidroxilase, indicando que as fêmeas apresentam mais tirosina hidroxilase na área tegmentar ventral. Por fim, uma vez que o estresse pode aumentar a liberação de dopamina na área tegmentar ventral via aumento da liberação do hormônio liberador de corticotropina, nós investigamos o imunocontéudo de CRHR1 e CRHR2 na área tegmentar ventral dos animais adolescentes (Burke & Miczek, 2014). Nós verificamos que houve influência do sexo e do ambiente sobre o imunocontéudo de CRHR1. Os machos separados aumentaram o imunocontéudo de CRHR1 enquanto que as fêmeas separadas diminuíram o imunocontéudo de CRHR1. Ambos os resultados foram contrários à presença de azeite de oliva. Esses resultados indicam que os efeitos induzidos pela separação materna sobre o comportamento alimentar, nos ratos machos, pode ser mediado pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Essa ativação pode influenciar na sinalização dopaminérgica e no sistema de recompensa promovendo um aumento no consumo de alimento doce. Enquanto que nas fêmeas outros fatores podem estar influenciando a sinalização dopaminérgica e o comportamento alimentar.

Além disso, as dietas com conteúdos lipídicos podem influenciar na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e por sua vez, podem regular marcadores envolvidos com a resposta ao estresse (Lee et al., 2014). No entanto, esses resultados ainda são inconclusivos e necessitam de experimentos futuros para relacionar com os nossos achados comportamentais.

Durante a realização dos testes comportamentais foi acompanhada a abertura do canal vaginal das fêmeas, entretanto somente no dia da eutanásia (DPN 53) foi possível realizar o lavado vaginal de todas as fêmeas para observar as fases do ciclo estral. Foi visto que a maioria das fêmeas estava na fase diestro do ciclo estral. A fase de diestro corresponde ao dia 2 da fase folicular, caracterizado pelo desenvolvimento de folículos e aumento nos níveis de estrógeno em ratas (Nelson, 2005). Não foi possível realizar a coleta do lavado vaginal das fêmeas durante o período das tarefas comportamentais uma vez o início do ciclo ovulatório nas ratas pode ocorrer do dia pós-natal 33 ao 46, com ciclos regulares apenas a partir do dia pós-natal 65, ou seja, na idade adulta (Laffan et al., 2017).

7. CONCLUSÃO

Coletivamente os nossos achados mostraram que a nutrição materna influenciou e programou mediadores moleculares envolvidos com o controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar. Essas observações foram sexo-específicas e principalmente quando os animais sofreram estresse no início da vida. Além disso, o nosso estudo forneceu evidências de que a SM é um potente estressor que prejudica o comportamento alimentar na adolescência dos animais de ambos os sexos. Essas alterações induzidas pela SM podem contribuir para disfunções no comportamento alimentar, tornando os animais mais vulneráveis ao consumo exagerado de alimentos e isso acarretar em sobrepeso e obesidade. O consumo de AO contribui para contrapor os efeitos induzidos pelo estresse, sugerindo que este tipo de óleo pode modular e por vezes, atenuar os efeitos da SM. Cabe ressaltar que durante as tarefas comportamentais não foi possível avaliar o ciclo estral uma vez que, durante esse período ocorreu variabilidade no tempo de abertura do canal vaginal. Assim, somente no dia da eutanásia (DPN 53) foi possível realizar o lavado vaginal de todas as fêmeas para observar as fases do ciclo estral, sendo que a maioria das fêmeas estava na fase diestro do ciclo estral.

8. PERSPECTIVAS

- Investigar o imunoconteúdo dos receptores de dopamina do tipo D1 no núcleo accumbens;
- Investigar o imunoconteúdo dos receptores de leptina e marcadores envolvidos com a sinalização da leptina no hipotálamo dos animais adolescentes;
- Investigar o imunoconteúdo dos receptores de leptina na área tegmentar ventral dos animais adolescentes;
- Investigar os níveis de dopamina e seus metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência no núcleo accumbens e área tegmentar ventral dos animais adolescentes.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, S. H., Lenoir, M., & Guillem, K. (2013). Neurobiology of addiction versus drug use driven by lack of choice. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(4), 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.028>
- B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., New York, 1994
- Arcego, D. M., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Ferreira, A. G. K., Scherer, E., Wyse, A. T. S., & Dalmaz, C. (2014). Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: Effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiology and Behavior*, 124, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.029>
- Arcego, D. M., Krolow, R., Lampert, C., Toniazzi, A. P., Berlitz, C., Lazzaretti, C., Schmitz, F., Rodrigues, A. F., Wyse, A. T. S., & Dalmaz, C. (2016). 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. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 50, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.03.001>
- Aya-Ramos, L., Contreras-Vargas, C., Rico, J. L., & Dueñas, Z. (2017). Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food and Function*, 8(7), 2592–2600. <https://doi.org/10.1039/c7fo00408g>
- Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in food addiction: Role of dopamine D2 receptors. *BMB Reports*, 46(11), 519–526. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.11.207>
- Bale, T. L., & Epperson, C. N. (2015). Sex differences and stress across the lifespan. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1413–1420. <https://doi.org/10.1038/nn.4112>
- Baxi, D. B., Singh, P. K., Vachhrajani, K. D., & Ramachandran, A. V. (2012). Plasticity changes in adult metabolic homeostasis and tissue oxidative stress: Neonatal programming by corticosterone and melatonin as deprogrammer. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25(6), 831–844. <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.599456>
- Becker, J. B. (2009). Sexual differentiation of motivation: A novel mechanism? *Hormones and Behavior*, 55(5), 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.014>
- Becker, J. B., Arnold, A. P., Berkley, K. J., Blaustein, J. D., Eckel, L. A., Hampson, E., Herman, J. P., Marts, S., Sadee, W., Steiner, M., Taylor, J., & Young, E. (2005). Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*, 146(4), 1650–1673. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1142>

- Behan, D. P., Grigoriadis, D. E., Lovenberg, T., Chalmers, D., Heinrichs, S., Liaw, C., & De Souza, E. B. (1996). Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Molecular psychiatry*, *1*(4), 265-277.
- Berridge, K. C. (2009). “Liking” and “wanting” food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology and Behavior*, *97*(5), 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.044>
- Berridge, K. C., Kringelbach, M. L., Arbor, A., & Hospital, W. (2016). Pleasure Systems of the Brain. *Neuron*, *86*(3), 646–664. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018>. Pleasure
- Blundell, J. E., Goodson, S., & Halford, J. C. G. (2001). Regulation of appetite: Role of leptin in signalling systems for drive and satiety. *International Journal of Obesity*, *25*, S29–S34. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801693>
- Brenhouse, H. C., & Andersen, S. L. (2011). Developmental trajectories during adolescence in males and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(8), 1687–1703. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.013>
- Brydges, N. M., Holmes, M. C., Harris, A. P., Cardinal, R. N., & Hall, J. (2015). Early Life Stress Produces Compulsive-Like, but Not Impulsive, Behavior in Females. *Behavioral Neuroscience*, *129*(3), 300–308. <https://doi.org/10.1037/bne0000059>
- Burke, A. R., & Miczek, K. A. (2014). Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. In *Psychopharmacology* (Vol. 231, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3369-1>
- Calvo, M., Naval, J., Lampreave, F., Uriel, J., & Pineiro, A. (1988). Fatty acids bound to α -fetoprotein and albumin during rat development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, *959*(3), 238-246. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(88\)90196-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(88)90196-8)
- Chocyk, A., Dudys, D., Przyborowska, A., Maćkowiak, M., & Wędzony, K. (2010). Impact of maternal separation on neural cell adhesion molecules expression in dopaminergic brain regions of juvenile, adolescent and adult rats. *Pharmacological Reports*, *62*(6), 1218–1224. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70385-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70385-6)
- Chocyk, A., Majcher-Maślanka, I., Przyborowska, A., Maćkowiak, M., & Wędzony, K. (2015). Early-life stress increases the survival of midbrain neurons during postnatal development and enhances reward-related and anxiolytic-like behaviors in a sex-dependent fashion.

- International Journal of Developmental Neuroscience*, 44, 33–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.05.002>
- Coccarello, R. (2019). Anhedonia in depression symptomatology: Appetite dysregulation and defective brain reward processing. *Behavioural Brain Research*, 372(March), 112041.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112041>
- Coccarello, R., & Maccarrone, M. (2018). Hedonic eating and the “delicious circle”: From lipid-derived mediators to brain dopamine and back. *Frontiers in Neuroscience*, 12(APR), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00271>
- Collins, G. T., Chen, Y., Tschumi, C., Rush, E. L., Mensah, A., Koek, W., & France, C. P. (2015). Effects of consuming a diet high in fat and/or sugar on the locomotor effects of acute and repeated cocaine in male and female C57BL/6J mice. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 23(4), 228–237. <https://doi.org/10.1037/pha0000019>
- Colorado, R. A., Shumake, J., Conejo, N. M., Gonzalez-Pardo, H., & Gonzalez-Lima, F. (2006). Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behavioural Processes*, 71(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.09.007>
- D’Aquila, P. S. (2010). Dopamine on D2-like receptors “reboots” dopamine D1-like receptor-mediated behavioural activation in rats licking for sucrose. *Neuropharmacology*, 58(7), 1085–1096. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.01.017>
- Da Silva, M. C., De Souza, J. A., Dos Santos, L. O., Pinheiro, I. L., Borba, T. K. F., Da Silva, A. A. M., De Castro, R. M., & De Souza, S. L. (2014). Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 5(3), 219–228.
<https://doi.org/10.1017/S204017441400018X>
- Dallman, M. F. (2010). Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(3), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.10.004>
- Dallman, M. F., Pecoraro, N. C., & La Fleur, S. E. (2005). Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(4), 275–280.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.11.004>
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., SF, A., SE, L. F., Gomez, F., & Houshyar, H. (2003). Chronic stress and obesity: A new view of „Äúcomfort food,Äù. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 11696. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1934666100
- de Lima, R. M. S., dos Santos Bento, L. V., di Marcello Valladão Lugon, M., Barauna, V. G.,

- Bittencourt, A. S., Dalmaz, C., & de Vasconcellos Bittencourt, A. P. S. (2020). Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. *Behavioural Brain Research*, 379(June 2019), 112399. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112399>
- de Souza, J. A., da Silva, M. C., de Matos, R. J. B., do Amaral Almeida, L. C., Beltrão, L. C., de Souza, F. L., de Castro, R. M., & de Souza, S. L. (2018). Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. *Appetite*, 123(2018), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.12.004>
- de Souza, J. A., do Amaral Almeida, L. C., Tavares, G. A., Falcão, L. de A. L., Beltrão, L. C., Costa, F. C. O., de Souza, F. L., da Silva, M. C., & de Souza, S. L. (2020). Dual exposure to stress in different stages of development affects eating behavior of male Wistar rats. *Physiology and Behavior*, 214(March 2019), 112769. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112769>
- Dziegielewska, K. M., Evans, C. A. N., Lai, P. C. W., Lorscheider, F. L., Malinowska, D. H., Møllgrd, K., & Saunders, N. R. (1981). Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal rats during development. *Developmental Biology*, 83(1), 193–200. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(81\)80024-3](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(81)80024-3)
- Eckenhoff, M. F., & Rakic, P. (1991). A quantitative analysis of synaptogenesis in the molecular layer of the dentate gyrus in the rhesus monkey. *Developmental Brain Research*, 64(1–2), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(91\)90216-6](https://doi.org/10.1016/0165-3806(91)90216-6)
- Entringer, S., Buss, C., Swanson, J. M., Cooper, D. M., Wing, D. A., Waffarn, F., & Wadhwa, P. D. (2012). Fetal programming of body composition, obesity, and metabolic function: the role of intrauterine stress and stress biology. *Journal of nutrition and metabolism*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/632548>
- Erlanson-Albertsson, C. (2005). How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 97(2), 61–73. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_179.x
- Ferreira, C. F., Bernardi, J. R., Krolow, R., Arcego, D. M., Fries, G. R., De Aguiar, B. W., Senter, G., Kapczinski, F. P., Silveira, P. P., & Dalmaz, C. (2013). Vulnerability to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 107, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.03.006>

- Figlewicz, D. P., Evans, S. B., Murphy, J., Hoen, M., & Baskin, D. G. (2003). Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Research*, *964*(1), 107–115. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04087-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04087-8)
- Freeman, ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In the physiology of reproduction. Second edition. New York. E Knobil and J. D. Neill, Raven Press. 1994; 613-58.
- Friemel, C. M., Spanagel, R., & Schneider, M. (2010). Reward sensitivity for a palatable food reward peaks during pubertal developmental in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00039>
- Fulton, S., Woodside, B. , Shizgal, P. (2000). Modulation of Brain Reward Circuitry by Leptin. *Science*, *287*(5450), 125–128. <https://doi.org/10.1126/science.287.5450.125>
- Galistu, A., & D'Aquila, P. S. (2012). Effect of the dopamine D1-like receptor antagonist SCH 23390 on the microstructure of ingestive behaviour in water-deprived rats licking for water and NaCl solutions. *Physiology and Behavior*, *105*(2), 230–233. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.006>
- Gehrand, A. L., Hoeyneck, B., Jablonski, M., Leonovicz, C., Ye, R., Scherer, P. E., & Raff, H. (2016). Sex differences in adult rat insulin and glucose responses to arginine: programming effects of neonatal separation, hypoxia, and hypothermia. *Physiological Reports*, *4*(18), 1–15. <https://doi.org/10.14814/phy2.12972>
- Genovese, A., Caporaso, N., Villani, V., Paduano, A., & Sacchi, R. (2015). Olive oil phenolic compounds affect the release of aroma compounds. *Food Chemistry*, *181*(August), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.097>
- Giacomini, M., Hahn, S., & de Oliveira Siqueira, L. (2013). Análise de correlação do perfil lipídico e dano oxidativo em pacientes diabéticos. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, *34*(2), 251–255.
- Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Medeiros-de-Moraes, I. M., De Oliveira, F. M. J., Burth, P., Bozza, P. T., Faria, M. V. C., Silva, A. R., & De Castro-Faria-Neto, H. C. (2016). Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153607>
- Grigsby, P. L. (2016). Animal Models to Study Placental Development and Function throughout Normal and Dysfunctional Human Pregnancy Peta. *Physiology & Behavior*,

- 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1570031>. *Animal*
- Harrold, J. A., Dovey, T. M., Blundell, J. E., & Halford, J. C. G. (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63(1), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.007>
- He, T., Guo, C., Wang, C., Hu, C., & Chen, H. (2020). Effect of early life stress on anxiety and depressive behaviors in adolescent mice. *Brain and Behavior*, 10(3), 1–10. <https://doi.org/10.1002/brb3.1526>
- Hollingsworth, K., Callaway, L., Duhig, M., Matheson, S., & Scott, J. (2012). The Association between Maltreatment in Childhood and Pre-Pregnancy Obesity in Women Attending an Antenatal Clinic in Australia. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051868>
- Hope, P. J., Turnbull, H., Farr, S., Morley, J. E., Rice, K. C., Chrousos, G. P., Torpy, D. J., & Wittert, G. A. (2000). Peripheral administration of CRF and urocortin: Effects on food intake and the HPA axis in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *Peptides*, 21(5), 669–677. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00196-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00196-0)
- Hryhorczuk, C., Sheng, Z., Décarie-Spain, L., Giguère, N., Ducrot, C., Trudeau, L. É., Routh, V. H., Alquier, T., & Fulton, S. (2018). Oleic Acid in the Ventral Tegmental Area Inhibits Feeding, Food Reward, and Dopamine Tone. *Neuropsychopharmacology*, 43(3), 607–616. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.203>
- Huttenlocher, P. R. (1979). Accepted July 13th, 1978. *Brain Research*, 163(2), 195–205. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899379903494>
- Hwang, J., Chang, Y. H., Park, J., Kim, S., Chung, H., Shim, E., & Hwang, H. (2011). Dietary saturated and monounsaturated fats protect against acute acetaminophen hepatotoxicity by altering fatty acid composition of liver microsomal membrane in rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 2–9. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-184>
- Ilchmann-Diounou, H., Olier, M., Lencina, C., Riba, A., Barretto, S., Nankap, M., Sommer, C., Guillou, H., Ellero-Simatos, S., Guzylack-Piriou, L., Théodorou, V., & Ménard, S. (2019). Early life stress induces type 2 diabetes-like features in ageing mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80(February), 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.025>
- Isogawa, K., Akiyoshi, J., Hikichi, T., Yamamoto, Y., Tsutsumi, T., & Nagayama, H. (2000). Effect of corticotropin releasing factor receptor 1 antagonist on extracellular norepinephrine, dopamine and serotonin in hippocampus and prefrontal cortex of rats in vivo. *Neuropeptides*, 34(3–4), 234–239. <https://doi.org/10.1054/npep.2000.0806>

- Jahng, J. W. (2011). An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Hormones and Behavior*, 59(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.11.010>
- Jaimes-Hoy, L., Gutiérrez-Mariscal, M., Vargas, Y., Pérez-Maldonado, A., Romero, F., Sánchez-Jaramillo, E., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (2016). Neonatal maternal separation alters, in a sex-specific manner, the expression of TRH, of TRH-degrading ectoenzyme in the rat hypothalamus, and the response of the thyroid axis to starvation. *Endocrinology*, 157(8), 3253–3265. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1239>
- Jarrett, M. M., Limebeer, C. L., & Parker, L. A. (2005). Effect of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol on sucrose palatability as measured by the taste reactivity test. *Physiology and Behavior*, 86(4), 475–479. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.033>
- Kelley, A. E., Bakshi, V. P., Haber, S. N., Steininger, T. L., Will, M. J., & Zhang, M. (2002). Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiology and Behavior*, 76(3), 365–377. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00751-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00751-5)
- Kenny, P. J. (2011). Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions. *Neuron*, 69(4), 664–679. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.016>
- Kirby, L. G., Rice, K. C., & Valentino, R. J. (2000). Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, 22(2), 148–162. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00093-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00093-7)
- Laffan, S. B., Posobiec, L. M., Uhl, J. E., & Vidal, J. D. (2018). Species comparison of postnatal development of the female reproductive system. *Birth defects research*, 110(3), 163-189. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1132>
- Lampert, C., Arcego, D. M., de Sá Couto-Pereira, N., dos Santos Vieira, A., Toniazzo, A. P., Krolow, R., Garcia, E., Vendite, D. A., Calcagnotto, M. E., & Dalmaz, C. (2017). Short post-weaning social isolation induces long-term changes in the dopaminergic system and increases susceptibility to psychostimulants in female rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 61, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.05.003>
- Laviola, G., Macrì, S., Morley-Fletcher, S., & Adriani, W. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 19–31. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00006-X)
- Lee, J. H., Kim, J. Y., & Jahng, J. W. (2014). Highly palatable food during adolescence improves anxiety-like behaviors and hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in

- rats that experienced neonatal maternal separation. *Endocrinology and Metabolism*, 29(2), 169–178. <https://doi.org/10.3803/EnM.2014.29.2.169>
- Lehmann, J., & Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: Consistent or confusing? *Reviews in the Neurosciences*, 11(4), 383–408. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2000.11.4.383>
- Liang, N. C., Hajnal, A., & Norgren, R. (2006). Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 291(5), 1236–1239. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00226.2006>
- Litvin, Y., Tovote, P., Pentkowski, N. S., Zeyda, T., King, L. B., Vasconcellos, A. J., Dunlap, C., Spiess, J., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2010). Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Hormones and Behavior*, 58(2), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.03.010>
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., ... & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332), 1659–1662. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1659>
- Lodge, D. J., & Grace, A. A. (2005). Acute and chronic corticotropin-releasing factor 1 receptor blockade inhibits cocaine-induced dopamine release: Correlation with dopamine neuron activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(1), 201–206. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084913>
- Lukkes, J. L., Watt, M. J., Lowry, C. A., & Forster, G. L. (2009). Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.018.2009>
- Lutter, M., & Nestler, E. J. (2009). Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *The Journal of Nutrition*, 139(3), 629–632. <https://doi.org/10.3945/jn.108.097618>
- Machado, T. D., Dalle Molle, R., Laureano, D. P., Portella, A. K., Werlang, I. C. R., Benetti, C. D. S., Noschang, C., & Silveira, P. P. (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. <https://doi.org/10.3109/10253890.2013.816841>
- Majcher-Maślanka, I., Solarz, A., Wędzony, K., & Chocyk, A. (2017). The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 57, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.01.001>

- Maniam, J., Antoniadis, C. P., Le, V., & Morris, M. J. (2016). A diet high in fat and sugar reverses anxiety-like behaviour induced by limited nesting in male rats: Impacts on hippocampal markers. *Psychoneuroendocrinology*, 68, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.03.007>
- Maniam, J., & Morris, M. J. (2010). Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology*, 35(5), 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.10.013>
- Maniam, J., & Morris, M. J. (2012). The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology*, 63(1), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.017>
- Marshall, A. T., Liu, A. T., Murphy, N. P., Maidment, N. T., & Ostlund, S. B. (2017). Sex-specific enhancement of palatability-driven feeding in adolescent rats. *PLoS ONE*, 12(7), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180907>
- Mauvais-Jarvis, F. (2015). Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biology of Sex Differences*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0033-y>
- Mela, V., Díaz, F., Vázquez, M. J., Argente, J., Tena-Sempere, M., Viveros, M. P., & Chowen, J. A. (2016). Interaction between neonatal maternal deprivation and serum leptin levels on metabolism, pubertal development, and sexual behavior in male and female rats. *Biology of Sex Differences*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0054-6>
- Mello, L. D., & Pinheiro, M. F. (2012). Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. *Alimentos e Nutrição*, 23(4), 537–548. <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/1417>
- Mennitti, L. V., Oliveira, J. L., Morais, C. A., Estadella, D., Oyama, L. M., Oller do Nascimento, C. M., & Pisani, L. P. (2015). Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(2), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.001>
- Midei, A. J., Matthews, K. A., Chang, Y. F., & Bromberger, J. T. (2013). Childhood physical abuse is associated with incident metabolic syndrome in mid-life women. *Health Psychology*, 32(2), 121–127. <https://doi.org/10.1037/a0027891>
- Miller, N. C., & Georgieff, M. K. (2017). Maternal Nutrition and Child Neurodevelopment: Actions Across Generations. *The Journal of pediatrics*, 187, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.04.065>
- Mineur, Y. S., Picciotto, M. R., & Sanacora, G. (2007). Antidepressant-Like Effects of Ceftriaxone in Male C57BL/6J Mice. *Biological Psychiatry*, 61(2), 250–252.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.04.037>

- Misiak, B., Kiejna, A., & Frydecka, D. (2015). The history of childhood trauma is associated with lipid disturbances and blood pressure in adult first-episode schizophrenia patients. *General Hospital Psychiatry*, *37*(4), 365–367. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2015.03.017>
- Møllgård, K., & Jacobsen, M. (1984). Immunohistochemical identification of some plasma proteins in human embryonic and fetal forebrain with particular reference to the development of the neocortex. *Developmental Brain Research*, *13*(1), 49–63. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(84\)90076-2](https://doi.org/10.1016/0165-3806(84)90076-2)
- Morin, J. P., Rodríguez-Durán, L. F., Guzmán-Ramos, K., Perez-Cruz, C., Ferreira, G., Diaz-Cintra, S., & Pacheco-López, G. (2017). Palatable hyper-caloric foods impact on neuronal plasticity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *11*(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00019>
- Moullé, V. S., Picard, A., Le Foll, C., Levin, B. E., & Magnan, C. (2014). Lipid sensing in the brain and regulation of energy balance. *Diabetes and Metabolism*, *40*(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2013.10.001>
- Murray, S., Tulloch, A., Gold, M. S., & Avena, N. M. (2014). Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, *10*(9), 540–552. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.91>
- Naleid, A. M., Grace, M. K., Cummings, D. E., & Levine, A. S. (2005). Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides*, *26*(11), 2274–2279. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.025>
- Nelson, R. J. (2005). An introduction to behavioral endocrinology. Sinauer Associates.
- Niki, M., Jyotaki, M., Yoshida, R., & Ninomiya, Y. (2011). Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids. *Sensory and Metabolic Control of Energy Balance*, 101-114.
- Pase, C. S., Teixeira, A. M., Roversi, K., Dias, V. T., Calabrese, F., Molteni, R., Franchi, S., Panerai, A. E., Riva, M. A., & Burger, M. E. (2015). Olive oil-enriched diet reduces brain oxidative damages and ameliorates neurotrophic factor gene expression in different life stages of rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(11), 1200–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.013>
- Peciña, S., & Smith, K. S. (2010). Hedonic and motivational roles of opioids in food reward: Implications for overeating disorders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *97*(1),

34–46. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.05.016>

- Père, M. C. (2003). Materno-foetal exchanges and utilisation of nutrients by the foetus: Comparison between species. *Reproduction Nutrition Development*, 43(1), 1–15. <https://doi.org/10.1051/rnd:2003002>
- Price, M. L., Curtis, A. L., Kirby, L. G., Valentino, R. J., & Lucki, I. (1998). Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity. *Neuropsychopharmacology*, 18(6), 492–502. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00197-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00197-8)
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Qosa, H., Mohamed, L. A., Batarseh, Y. S., Alqahtani, S., Ibrahim, B., LeVine, H., Keller, J. N., & Kaddoumi, A. (2015). Extra-virgin olive oil attenuates amyloid- β and tau pathologies in the brains of TgSwDI mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1479–1490. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.022>
- Raff, H., Hoeynck, B., Jablonski, M., Leonovicz, C., Phillips, J. M., & Gehrand, A. L. (2018). Insulin sensitivity, leptin, adiponectin, resistin, and testosterone in adult male and female rats after maternal-neonatal separation and environmental stress. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 314(1), R12–R21. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00271.2017>
- Rao, S. B. N., Prasad, K. S., & Rajendra, D. (2013). Recent Advances in Amelioration of Anti-Nutritional Factors in Livestock Feedstuffs. *Animal Nutrition and Reproductive Physiology (Recent Concepts)*, January, 655–678.
- Reul, J. M. H. M., & Holsboer, F. (2002). Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Current Opinion in Pharmacology*, 2(1), 23–33. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00117-5)
- Reynolds, C. M., Segovia, S. A., & Vickers, M. H. (2017). Experimental models of maternal obesity and neuroendocrine programming of metabolic disorders in offspring. *Frontiers in endocrinology*, 8, 245. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00245>
- Ribeiro, G., & Santos, O. (2013). Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 8(2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.rpedm.2013.09.001>
- Romero, C. E. M., & Zanesco, A. (2006). O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Revista de Nutricao*, 19(1), 85–91. <https://doi.org/10.1590/s1415->

52732006000100009

- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licon-Limón, P., José Valdéz-Alarcón, J., & Lajud, N. (2018). Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*, *96*(300), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.012>
- Ryu, V., Yoo, S. B., Kang, D. W., Lee, J. H., & Jahng, J. W. (2009). Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. *Brain Research*, *1295*, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.006>
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2012). The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine. *Neuron*, *76*(3), 470–485. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.021>
- Sarnyai, Z., Shaham, Y., & Heinrichs, S. C. (2001). The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacological reviews*, *53*(2), 209-244.
- Sasaki, T., Matsui, S., & Kitamura, T. (2016). Control of appetite and food preference by NMDA receptor and its co-agonist D-Serine. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071081>
- Saunders, N. R., & Møllgård, K. (1981). The natural internal environment of the developing brain. Beyond the barrier. *Trends in Neurosciences*, *4*(C), 56–60. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0166-2236(81)90020-5)
- Sauvage, M., & Steckler, T. (2001). Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei - Potential implication for arousal and attention. *Neuroscience*, *104*(3), 643–652. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00137-3)
- Schmitz, Y., Lee, C. J., Schmauss, C., Gonon, F., & Sulzer, D. (2001). Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: Effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *Journal of Neuroscience*, *21*(16), 5916–5924. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-05916.2001>
- Schroeder, A., Notaras, M., Du, X., & Hill, R. A. (2018). On the developmental timing of stress: Delineating sex-specific effects of stress across development on adult behavior. *Brain Sciences*, *8*(7), 1–29. <https://doi.org/10.3390/brainsci8070121>
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Clemente, Z., Bassani, E., Tabajara, A. S., Gamaro, G. D., Dantas, G., Torres, I. L. S., Lucion, A. B., & Dalmaz, C. (2004). Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiology and Behavior*, *80*(5), 739–745.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.12.009>

- Slawecki, C. J. (2005). Comparison of anxiety-like behavior in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behavioral Neuroscience*, *119*(6), 1477–1483. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.6.1477>
- Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D’Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Rizzo, C., Capurso, A., & Panza, F. (2006). Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: A 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiology of Aging*, *27*(11), 1694–1704. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.026>
- Spann, S. J., Gillespie, C. F., Davis, J. S., Brown, A., Schwartz, A., Wingo, A., Habib, L., & Ressler, K. J. (2014). The association between childhood trauma and lipid levels in an adult low-income, minority population. *General Hospital Psychiatry*, *36*(2), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2013.10.004>
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 24, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2)
- Spear, Linda Patia, & Varlinskaya, E. I. (2010). Model of Adolescence: Implications for Prevention Science? *Developmental Psychobiology*, *52*(3), 236–243. <https://doi.org/10.1002/dev.20457>.Sensitivity
- Spector, A. A. (1978). Transport of fatty acid in circulation. *Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism*.
- Spivey, J. M., Shumake, J., Colorado, R. A., Conejo-Jimenez, N., Gonzalez-Pardo, H., & Gonzalez-Lima, F. (2009). Adolescent female rats are more resistant than males to the effects of early stress on prefrontal cortex and impulsive behavior. *Developmental Psychobiology*, *51*(3), 277–288. <https://doi.org/10.1002/dev.20362>
- Sturman, D. A., & Moghaddam, B. (2011). The neurobiology of adolescence: Changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(8), 1704–1712. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.003>
- Takahashi, L. K. (2001). Role of CRF1 and CRF2 receptors in fear and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *25*(7–8), 627–636. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00046-X)
- Takeda, M., Sawano, S., Imaizumi, M., & Fushiki, T. (2001). Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice

- test. *Life Sciences*, 69(7), 847–854. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01180-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01180-8)
- Tirelli, E., Laviola, G., & Adriani, W. (2003). Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 163–178. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00018-6)
- Turner, R., Etienne, N., Alonso, M. G., De Pascual-Teresa, S., Minihane, A. M., Weinberg, P. D., & Rimbach, G. (2005). Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 75(1), 61–70. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.75.1.61>
- Uriel, J., Trojan, J., Moro, R., & Pineiro, A. (1983). INTRACELLULAR UPTAKE OF ?-FETOPROTEIN: A MARKER OF NEURAL DIFFERENTIATION. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 417(1 Oncodevelopment), 321–329. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb32875.x>
- van de Sande-Lee, S., & Velloso, L. A. (2012). Disfunção hipotalâmica na obesidade TT - Hypothalamic dysfunction in obesity. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 56(6), 341–350. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302012000600001>
- van Reedt Dortland, A. K. B., Giltay, E. J., van Veen, T., Zitman, F. G., & Penninx, B. W. J. H. (2012). Personality traits and childhood trauma as correlates of metabolic risk factors: The Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 36(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.10.001>
- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., & Lajud, N. (2016). Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. *PLoS ONE*, 11(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162665>
- Vasconcelos, M., Stein, D. J., Gallas-Lopes, M., Landau, L., & de Almeida, R. M. M. (2020). Corticotropin-releasing factor receptor signaling and modulation: implications for stress response and resilience. *Trends in psychiatry and psychotherapy*, 42(2), 195–206. <https://doi.org/10.1590/2237-6089-2018-0027>
- Viveros, M. P., Díaz, F., Mateos, B., Rodríguez, N., & Chowen, J. A. (2010). Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Hormones and Behavior*, 57(4–5), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.009>
- Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: Implications

- for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(12), 741–752.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>
- Wang, Y., Wu, B., Yang, H., & Song, X. (2015). The effect of childhood abuse on the risk of adult obesity. *Annals of Clinical Psychiatry*, 27(3), 175–184. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247216>
- Walker, D. M., Bell, M. R., Flores, C., Gulley, J. M., Willing, J., & Paul, M. J. (2017). Adolescence and reward: Making sense of neural and behavioral changes amid the chaos. *Journal of Neuroscience*, 37(45), 10855–10866.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1834-17.2017>
- Weathington, J. M., & Cooke, B. M. (2012). Corticotropin-releasing factor receptor binding in the amygdala changes across puberty in a sex-specific manner. *Endocrinology*, 153(12), 5701–5705. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1815>
- Willing, J., & Juraska, J. M. (2015). The timing of neuronal loss across adolescence in the medial prefrontal cortex of male and female rats. *Neuroscience*, 301(5), 268–275.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.073>
- Wilmouth, C. E., & Spear, L. P. (2009). Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: Taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(4), 566–573. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.02.009>
- Yam, K. Y., Ruigrok, S. R., Ziko, I., De Luca, S. N., Lucassen, P. J., Spencer, S. J., & Korosi, A. (2017). Ghrelin and hypothalamic NPY/AgRP expression in mice are affected by chronic early-life stress exposure in a sex-specific manner. *Psychoneuroendocrinology*, 86, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.09.006>
- Yorgason, J. T., España, R. A., Konstantopoulos, J. K., Weiner, J. L., & Jones, S. R. (2013). Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. *European Journal of Neuroscience*, 37(6), 1022–1031.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12113>

ANEXO A - Carta de Aprovação da CEUA



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37803

Título: ESTUDO DO CONSUMO DE AZEITE DE OLIVA SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR HEDONICO DE RATOS ADOLESCENTES SUBMETIDOS A SEPARACAO MATERNA

Vigência: 06/08/2019 à 31/08/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Rachel Krolow Santos Silva Bast - coordenador desde 06/08/2019
Natividade de Sá Couto Pereira - pesquisador desde 06/08/2019
Jade De Oliveira - pesquisador desde 06/08/2019
ANA CAROLINE SILVA SILVEIRA - Aluno de Mestrado desde 06/08/2019
Alessandra Gonçalves Machado - Aluno de Doutorado desde 06/08/2019
Ariadni Mesquita Peres - Aluno de Mestrado desde 06/08/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 09/12/2019 - Sala 56 do prédio 11209 - Salas de aula do Campus Centro - Porto Alegre/RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 224 ratos wistar neonatos (112 machos e 112 fêmeas), oriundos de 50 ninhadas de 50 genitoras, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 3 de Janeiro de 2020

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B - Composição lipídica do óleo de soja utilizado

Tabela Suplementar 1. Ácidos graxos presentes no óleo de soja (%)

Palmítico C16:0	14,5
Estearico C18:0	5,0
Oleico C18:1	34,0
Linoleico C18:2	60,0
Linolênico C18:3	8,0
Total saturado	16,67
Total monoinsaturados	29,17
Total poliinsaturados	54,17