

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

**JACKELINE MARTINS EBERHARDT DE SOUZA**

**ESTRESSE PRECOCE DE NINHO EMPOBRECIDO: AVALIAÇÃO DO  
COMPORTAMENTO ALIMENTAR**

Porto Alegre

2023

**JACKELINE MARTINS EBERHARDT DE SOUZA**

**ESTRESSE PRECOCE DE NINHO EMPOBRECIDO: AVALIAÇÃO DO  
COMPORTAMENTO ALIMENTAR**

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Mirna Bainy Leal  
**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Camilla Lazzaretti

Porto Alegre

2023

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Jackeline Martins Eberhardt de Souza

ESTRESSE PRECOCE DE NINHO EMPOBRECIDO: AVALIAÇÃO DO  
COMPORTAMENTO ALIMENTAR E MECANISMOS NEUROQUÍMICOS  
ENVOLVIDOS.

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

**Orientadora:** Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

**Co-Orientadora:** Profa Dra Profa Dra Camilla Lazzaretti

**Aprovado em:** Porto Alegre, 13 de junho de 2023

BANCA EXAMINADORA:

---

Professora Doutora Carla Dalmaz  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Professora Doutora Fernanda Barbosa Lima  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Professora Doutora Rosa Maria Martins de Almeida  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado o dom da vida e me proporcionar realizar essa conquista tão gratificante, sem Ele eu nada seria. Agradeço principalmente a minha mãe Lúcia, sem a educação, o carinho, cuidado e incentivo que você me proporcionou eu não teria chegado até aqui. A minha família e o meu namorado que sempre estiveram presente me apoiando e incentivando. Agradeço imensamente às minhas orientadoras: Mirna Bainy Leal e a Camilla Lazzaretti, por toda paciência, por todo carinho e cuidado com esse trabalho e comigo, foi muito gratificante ter vocês como mentoras. Agradeço a todos os professores da instituição, obrigada por todo conhecimento. Aos meus colegas de laboratório que foram muito importantes na realização dessa pesquisa. E a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Meu muito obrigada!

Agradeço o PPG Neurociências, o departamento de Bioquímica da UFRGS por possibilitarem o andamento do trabalho, assim como a CAPES pela bolsa de estudo e a UFRGS por ser uma universidade de grande renome e fornecer um ensino de qualidade.

## RESUMO

O estresse precoce (EP) no período neonatal (PN) modula vias encefálicas envolvidas na geração de respostas hedônicas. Deste modo, o consumo de alimentos palatáveis ao longo da vida pode ser alterado pelo EP, e isto é demonstrado em modelos animais em ratos, com intervenções neste período, como a manipulação neonatal, e a separação materna. Um modelo animal que vem ganhando destaque neste aspecto é a restrição da maravalha do ninho, do inglês "Limited bedding and nesting" (LBN). O protocolo de LBN é realizado nos primeiros dias de vida da ninhada de ratos, do dia 2 ao 9 pós-nascimento (PND), com a produção de um ninho empobrecido pela mãe, com apenas uma toalha de papel fornecida pelo experimentador, na caixa de moradia. A ninhada torna-se estressada junto da genitora, com consequências a longo prazo no comportamento de brincar, bem como frente a drogas de abuso, demonstrando anedonia. Uma das causas destes efeitos nos filhotes se deve por modificações no cuidado materno, que torna-se fragmentado e caótico levado pela falta de subsídio na construção do ninho. Junto disso, o modelo de LBN tem sido descrito com potencial translacional, semelhante a mães deprimidas ou que abusem de substâncias psicoativas. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar em ratos adultos (machos e fêmeas) submetidos ao protocolo LBN e controles, o comportamento frente a alimentos palatáveis. Com isso, os animais (machos: controles, N=13, LBN=16; fêmeas: controles, N=15, LBN=12) foram submetidos ao protocolo de LBN, do PND 2 a 9. Após isso, a caixa moradia retomou as condições normais com a presença de maravalha, e, no PND 21 de vida os animais foram desmamados e se a sexagem ocorreu. No PND 60 de vida os animais permaneceram sem nenhuma outra alteração em ambiente de biotério quando foram randomizados. Aos 70 dias de vida, iniciou-se a tarefa do corredor, que avalia o tempo para a busca e consumo em gramas de alimento palatável, a partir dos treinos, e, após 5 dias o teste foi realizado, para avaliação do comportamento alimentar a cereais doces (Froot Loop's Kellog's®). Aos 90 dias, os animais foram submetidos a um estresse agudo com choque nas patas e posteriormente foi executada a avaliação do consumo e preferência alimentar em caixa moradia, para verificação se um segundo desafio estressor agudo, pode modificar a ingestão de alimento doce. Foi verificado se um desafio agudo pode alterar o padrão de consumo dos animais. Ao final dos experimentos, aos 100 dias de vida os animais eutanasiados. Os resultados demonstraram que no teste do corredor houve uma diferença entre os sexos nos grupos controles, onde as fêmeas chegaram mais rápido ao alimento doce, entretanto os animais de ambos os sexos, submetidos ao protocolo LBN, levaram mais tempo para iniciar a comer o alimento doce quando comparados ao controle. Quando avaliou-se o consumo de alimentos após o estresse agudo por choque nas patas, observou-se que os animais machos submetidos ao protocolo LBN ingerem maior quantidade de alimento em relação ao controle, tanto imediatamente após quanto 24 horas após o choque. E as fêmeas consomem maior quantidade de cereal doce em relação aos machos tanto antes quanto depois do choque independente de grupo. Entretanto, a medida do consumo de ração padrão ao longo das treze semanas demonstrou que as fêmeas ingerem proporções inferiores em relação aos machos. Houve também um menor consumo de ração padrão pelos animais LBN em comparação aos seus controles. Observou-se que o comportamento alimentar possui alterações relacionadas a motivação dos animais para comer o alimento doce. Estes comportamentos podem estar relacionados com as vias neuroquímicas de regiões como núcleo accumbens e córtex pré-frontal. Sugere-se a

necessidade da realização de mais experimentos testando comportamentos específicos, bem como as vias neuroquímicas envolvidas.

**Palavras-chaves:** Alimentação. Estresse. LBN.

## ABSTRACT

Early life stress (ELS) in the neonatal period (NP) modulates brain pathways involved in the generation of hedonic responses. Thus, the consumption of palatable foods throughout life can be altered by the EIS, which was demonstrated in animal models with rats submitted to interventions in this period, such as neonatal handling and maternal separation. The animal model that has been gaining prominence in this regard is the restriction of nest shavings, named "*Limited bedding and nesting*" (LBN). The LBN protocol is executed in the first days of life of the rat litter, from day 2 to 9 postnatal day (PND), with the construction of an impoverished nest by the mother, with only a paper towel provided by the experimenter, in the home cage. The litter became stressed alongside their mother, with long-term consequences on playing behavior as well as on the use of drugs, presenting anhedonia. One of the causes of these effects on the litter is due to the changes in maternal care, which becomes fragmented and chaotic as a result of the lack of support for nest building. Furthermore, the LBN model has been described with translational potential, similar to depressed mothers or mothers who abuse psychoactive substances. Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the behavior towards palatable foods of adult rats (male and female) that were submitted to the LBN protocol and controls. The animals that were submitted to the LBN protocol from day 2 to 9 post-birth (PB). After that, the home cage returned to normal conditions with the presence of wood shavings, and at 21 days of life, the animals were weaned and shared by sex. On day 60 of life, the animals remained without any other changes in the vivarium environment when they were randomized. At PND 70, the runway task was started, initiated by training and after 5 days the test was performed to evaluate the eating behavior towards sweet cereals (Kellogg's Froot Loop's). At 90 days, the animals were submitted to a second hit stress of foot shock and later the evaluation of the consumption and food preference was carried out in a home-cage. It was verified whether an acute challenge could change the food consumption pattern of the animals. At the end of the experiments, at 100 days of life, the animals were euthanized. The results showed that in the runway task, there was a difference between the sexes in the control groups, where the females reached the sweet food faster, however, the animals of both sexes that went through the LBN protocol, took longer to start eating the sweet food when compared to the control group. When the food consumption after acute stress due to the shock experience was evaluated, it was observed that male animals submitted to the LBN protocol ingested more food when compared to the control group, both immediately and in the 24 hours after the shock. Females consumed more sweet cereal than males both before and after the shock, regardless of the group. Nonetheless, the measurement of standard feed intake over the thirteen weeks showed that females ingest smaller portions than males. There was also a lower consumption of standard feed by LBN animals compared to their controls. It was observed that eating behavior has changes related to the animals' motivation to eat sweet food. These behaviors may be related to neurochemical pathways in regions such as the nucleus accumbens and prefrontal cortex. It is suggested the need to carry out more experiments testing specific behaviors, as well as the neurochemical pathways involved.

**Keywords:** Feeding. Stress. LBN.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACTH** Hormônio adrenocorticotrópico

**Ag** Amígdala

**AN** Anedonia

**CPF** Córtex Pré-frontal

**EP** Estresse precoce

**HPA** Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

**LBN** Restrição da Maravalha do Ninho (do inglês "Limited bed and nesting")

**MN** Manipulação neonatal

**NAc** Núcleo Accumbens

**PHE** Período hiporresponsivo ao estresse

**PM** Privação Materna

**PND** Pós nascimento

**PN** Período Neonatal

**POMC** Pró-opiomelanocortina

**SM** Separação Materna

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 O desenvolvimento do Eixo Hipófise- Pituitária-Adenal	11
1.2 Modelo animal de estresse de ninho empobrecido (LBN)	12
1.3 Vias encefálicas do comportamento alimentar e modificações associadas ao estresse precoce no período neonatal	14
1.4 Comportamento alimentar e Anedonia em animais LBN	15
<b>2. OBJETIVO</b>	16
2.1 Objetivos específicos	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	17
3.1 Animais	17
3.2 Ninho empobrecido	18
3.3 Teste do corredor: comportamento do corredor	18
3.4 Avaliação da resposta ao estresse aguda no comportamento alimentar	19
3.5 Avaliação do peso dos animais e quilocalorias consumidas	20
3.6 Averiguação do ciclo estral	21
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	21
<b>5. RESULTADOS</b>	22
5.1 Teste do corredor: comportamento alimentar	22
5.2 Avaliação da resposta ao estresse agudo no comportamento alimentar	24
5.3 Avaliação do peso dos animais e consumo de ração padrão ao longo da vida	25
5.3.1 Avaliação do consumo de ração padrão na terceira e quarta semana de vida dos animais (puberdade das fêmeas e machos respectivamente)	28
5.4 Avaliação do ciclo estral como fator interferente nos testes comportamentais	29
5.4.1 Ciclo estral e teste do corredor: comportamento alimentar	29
5.4.2 Ciclo estral e avaliação da resposta alimentar ao estresse agudo	30
<b>6. DISCUSSÃO</b>	30
<b>7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b>	35
<b>REFERÊNCIAS</b>	37
<b>ANEXO A</b>	41

## 1. INTRODUÇÃO

Os períodos pós-nascimento e a infância são conhecidamente janelas de vulnerabilidade a alterações no neurodesenvolvimento, pois nestes momentos há uma extensa neuroplasticidade (Leyrer-Jackson et al. 2021). O estresse precoce devido a episódios traumáticos (ex: estresse por maus-tratos infantis, negligência parental, abusos físicos, psicológicos e sexuais) são acontecimentos que deixam marcas permanentes no indivíduo e aumentam os riscos para o surgimento e a permanência de certos transtornos, como a depressão, abuso de substâncias psicoativas como álcool e drogas, transtornos alimentares, entre outros (Williams et al. 2022).

O estresse no período neonatal (PN) pode ser evidenciado por eventos traumáticos sofridos pela mãe no puerpério (luto, ansiedade e depressão), que modifica seu padrão de cuidados com a prole, tanto em humanos quanto em modelos animais em roedores. Desta forma, estas situações aversivas podem levar a perturbações no desenvolvimento da circuitaria do eixo hipotálamo-pituitária- adrenal (HPA) dos filhotes. Diante disso, alterações comportamentais e metabólicas a longo prazo podem ser promovidas, como é o caso de transtornos alimentares e suas consequências: (i) compulsão alimentar e obesidade, ou má nutrição; (ii) respostas alteradas à comportamentos recompensadores; e (iii) em humanos uma maior sensibilidade à rejeição, o que pode ser um gatilho desencadeador à psicopatologias relacionadas a alimentação (Chami et al. 2018).

Modelos animais de adversidades precoces no PN podem mimetizar situações de estresse no início da vida. São exemplos bem descritos na literatura, a manipulação neonatal (MN), a separação (SM) e a privação materna (PM), que induzem alterações no cuidado materno neste período (Gallo et al. 2019). Como consequência, a MN, por exemplo, induz um remodelamento do comportamento alimentar dos filhotes a longo prazo, o que promove respostas alteradas a alimentos palatáveis (doces e salgados). Junto disso, animais MN possuem uma diminuição de resposta a substâncias no metabolismo da dopamina no núcleo accumbens (NAc) (Leyrer-Jackson et al. 2021).

Um modelo experimental de estresse precoce, que atualmente vem sendo estudado com ênfase é o ninho empobrecido, do inglês “*Limited bedding and nesting*” (LBN). Este modelo promove uma restrição da maravalha do ninho de ratos, normalmente do segundo dia de vida até o nono, o que repercute no comportamento materno, levando a uma hipervigilância em relação aos filhotes. Este aspecto materno para com a ninhada pode ser um fator indutor dos efeitos comportamentais e neuroquímicos do modelo LBN observado nos filhotes ao longo da vida (Gallo et al. 2019). O modelo de LBN pode modular a resposta a eventos estressores na idade adulta, e desta forma gerar consequências negativas, por exemplo em comportamentos do tipo depressivo, ansioso e frente a recompensas palatáveis (Williams et al. 2022).

### **1.1 O desenvolvimento do Eixo Hipófise- Pituitária-Adenal**

A responsividade do eixo HPA difere entre as fases de desenvolvimento pré e pós-natal do rato. Durante o período fetal há uma grande secreção do glicocorticóide corticosterona, seguida por uma moderada resposta ao estresse no momento do nascimento, e finalmente acompanhada de sua diminuição até a segunda semana de vida pós-natal, denominado período hiporresponsivo ao estresse (PHE) (Kent et al. 2022). A ocorrência do PHE está relacionada à diminuição da atividade do eixo HPA ao final da gestação, que afeta também o PN. Diante disso, o filhote possui uma imaturidade dos secretagogos adrenocorticais, e sua mediação se dá, sobretudo via diminuição da sensibilidade da adrenal ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), e um aumento exacerbado da retroalimentação negativa dos glicocorticóides na hipófise (Kent et al. 2022; Gallo et al. 2019). Por essas razões, há nessa fase uma diminuição da resposta do eixo HPA a estímulos nocivos e o comportamento de cuidado materno nesta fase é decisório para a manutenção do PHE (Kent et al. 2022; Eck et al. 2020). No entanto, mesmo com a concentração total de corticosterona plasmática baixa, a fração biologicamente ativa é relativamente alta. Isto permite a manutenção das ações fisiológicas deste hormônio no desenvolvimento de órgãos como pulmões, pâncreas e sistema nervoso, durante o PHE (Kent et al. 2022; Yam et al. 2017). Negligência parental e estresse no PN podem exacerbar o funcionamento do eixo HPA nesta fase, o que não condiz com o desenvolvimento fisiológico no

animal. Em humanos, sabe-se que este fenômeno também é observado, entretanto ainda não é compreendido exatamente o período de ocorrência, o que indica ser entre seis e 12 meses de idade (Eck et al. 2020; Van Bodegom et al. 2017). Gradualmente, em seguida ao PHE, há um aumento da responsividade adrenocortical ao ACTH devido à maturação fisiológica do rato, sendo esse período em torno dos 14-21 dias de vida (Van Bodegom et al. 2017).

## **1.2 Modelo animal de estresse de ninho empobrecido (LBN)**

O modelo de LBN, como já citado anteriormente, demonstra o empobrecimento do ninho dos animais, com a ausência de maravalha no período neonatal. É considerado um estresse robusto para os filhotes bem como para a genitora da ninhada devido às seguintes condições estabelecidas na caixa moradia:

(i) Diminuição de constituintes do ninho: ocorre a ausência de maravalha, porém com a adição de uma folha de papel toalha e um assoalho metálico. Desta forma, a mãe constrói o ninho com pedaços de papel, contudo há dificuldade de enterrar os filhotes, e sendo assim o ambiente torna-se empobrecido. A limpeza e troca de toalhas de papel se dá, segundo a literatura, a cada dois dias (Bolton et al. 2019; Eck et al. 2020).

(ii) Tempo de estresse: de acordo com o protocolo postulado por Bolton et al. 2018, o modelo de LBN se dá do dia pós-natal (PND) 2 até o 9. Após este período a caixa moradia retoma os aspectos normais de assoalho de maravalha, até o momento do desmame e sexagem, no PND 21 (Bolton et al. 2019; Walker et al. 2017).

Unido às circunstâncias do ambiente, o modelo de LBN modifica o padrão do cuidado materno.

Piores condições de vida levadas pela vulnerabilidade social, e pobreza, geram consequências como a fome, falta de abrigo adequado, água ou serviços de saúde. Como consequência, o estresse precoce se estabelece entre mães e filhos e com isso, efeitos diretos no neurodesenvolvimento podem ocorrer gerando impactos intergeracionais que provavelmente afetam a saúde e a função mental, não apenas dos indivíduos diretamente afetados, mas também de seus descendentes (Walker et al. 2017). O modelo de LBN, possui repercussões persistentes ao longo da vida dos filhotes, visto que, o período neonatal é um momento de grande sensibilidade neural a alterações ambientais. Em 2019, Bolton e colaboradores em um estudo de revisão

realizaram um mapeamento das regiões encefálicas consideradas “chave” para o desencadeamento de modificações levadas pelo modelo. Foi observado que esta adversidade leva a um aumento da atividade excitatória glutamatérgica no núcleo paraventricular do hipotálamo na população de neurônios liberadores de CRH. E este efeito se mantém, induzindo uma hiperatividade do eixo HPA na idade adulta. Já nas experiências de cuidado materno adequado e previsível, o número de neurônios desta região é menor e o eixo neuroendócrino possui funcionamento basal (Bolton et al. 2019; Sanchez et al. 2021).

Já é evidenciado na literatura que o estresse precoce pode predispor os indivíduos ao abuso de substâncias psicoativas bem como a transtornos alimentares (Leyrer-Jackson et al. 2021). Estudos bioquímicos indicam que o estresse por LBN induz a variações no hormônio gástrico indutor da fome, a grelina, durante a infância dos animais, particularmente em fêmeas. Além disso, vias hipotalâmicas compostas de neurônios liberadores de neuropeptídeo Y e peptídeo agouti (AgRP) mostraram-se mais densas em animais LBN jovens. Contudo, a quantificação de ração ingerida não foi mensurada (Yam et al. 2017).

### **1.2.1 Comportamento materno em ninhadas LBN**

O comportamento materno no modelo de LBN possui quantitativamente aspectos normais de uma ninhada de roedores: lambidas, grooming, lambidas anogenitais e o carregamento dos filhotes. Contudo, é evidenciado na literatura uma fragmentação deste, onde torna-se caótico e imprevisível em tempo de duração, quando comparado aos controles (Ivy et al. 2008; Rice et al. 2008; Gallo et al. 2019). Também é descrito que a rata genitora possui aumento na ansiedade e corticosterona, e mantém um comportamento hipervigilante e atento frente à ninhada, demonstrado com um aumento de entradas e saídas do ninho e interrompendo comportamentos individuais dos filhotes. Junto disso, é evidenciado por Gallo et al. 2019, uma conduta do tipo abusiva e agressiva, em que a mãe promove atos como o de chutar os filhotes seguidamente por maior tempo de duração, principalmente no período claro, em comparação aos controles. Estes comportamentos maternos foram descritos serem dependentes do ciclo circadiano, onde na fase clara há interações aberrantes da mãe com os filhotes, e isso resulta em condições psicopatológicas nos filhotes, como descrito por Goodwill et al. 2019, em que há hipersônia e

comportamento do tipo depressivo. Por isso, hipotetiza-se que os efeitos do estresse por LBN nos filhotes seja uma consequência do comportamento materno durante o período neonatal. Segundo Walker, em 2017, o modelo LBN possui um aspecto translacional com semelhança ao estresse em humanos nesse momento da vida, entre mãe e filho.

### **1.3 Vias encefálicas do comportamento alimentar e modificações associadas ao estresse precoce no período neonatal**

A alimentação pode ser encarada como algo prazeroso e não apenas homeostático. Com isso, o encéfalo diante de um alimento saboroso recebe estímulos sensoriais através da percepção lingual do sabor que ascende ao tronco encefálico, tálamo e ao córtex gustatório insular. Após, esta informação chega ao estriado ventral mais conhecido como NAc que estimula circuitos de recompensa. O seguimento da projeção se dá do NAc para núcleos hipotalâmicos, mesencéfalo e córtex frontal e suas sub-regiões como o órbito- frontal. A ingestão de alimentos palatáveis doces ativa vias no sistema mesolímbico, com a liberação de dopamina na expectativa da chegada da recompensa e receptores opióides do tipo  $\mu$  no NAc (Sanchez et al. 2021). Da mesma maneira, estudos que avaliam a antecipação de recompensas nos distúrbios alimentares mostram um aumento de atividade no NAc (Laguna et al. 2021).

Os modelos animais de PM e SM ambos no período neonatal, indicam um aumento do consumo alimentar palatável e decréscimo de ração padrão na idade adulta. Estes pontos são detalhados no estudo de Lima et al. 2019, que apontou que a PM diminui o neuropeptídeo hipotalâmico pró-opiomelanocortina (POMC), que auxilia na indução de saciedade, de maneira sexo específica apenas em machos e uma maior resiliência das fêmeas ao estresse (Lima et al. 2019).

Já no NAc o estresse precoce pode moldar as vias encefálicas, e por isso alterar respostas a recompensas palatáveis. A partir destes aspectos, o comportamento alimentar pode ser programado a longo prazo, tanto em roedores como em humanos. Um exemplo disso é o modelo animal de MN, que leva a breve separação entre a mãe e os filhotes após o nascimento, induz a um aumento da ingestão de cereais doces (Froot loops Kelloggs®) na vida adulta, em relação aos

controles, com menor latência para consumo. Quando estes animais são expostos cronicamente a chocolate na idade adulta, nota-se um acréscimo no consumo nas primeiras horas de apresentação do novo alimento bem como ao longo do tempo (Bolton et al. 2018, Noschang et al. 2012, Silveira et al. 2010).

Quando animais LBN são expostos a dietas crônicas palatáveis, com alto teor de carboidratos ou gorduras, percebe-se uma modificação em marcadores neuroquímicos, como o receptor GR em hipocampo, onde a combinação de ambas variáveis (estresse e dieta) induz seu aumento. Junto disso, modificações metabólicas também são observadas, como maior deposição de gordura abdominal e uma diminuição na sinalização intracelular de receptores de leptina, essenciais para a indução de saciedade (Cunha et al. 2020). O comportamento do tipo ansioso é um aspecto relevante relacionado ao comportamento alimentar. Verificou-se no estudo de Bazhan et al. 2020, que animais originados em ninhos empobrecidos e alimentados com dietas ricas em açúcares e gorduras, do desmame até a idade adulta, mostraram menor ansiedade que aqueles com ração padrão. Desta maneira, nota-se que possivelmente os roedores LBN podem possuir um comportamento alimentar diferenciado, o que leva a alterações subsequentes encefálicas e comportamentais (Bazhan. et al. 2020).

Eventos estressores agudos podem ser desencadeantes de episódios de compulsão ou até mesmo uma inibição alimentar em humanos e ratos saciados, pois através da resposta ao estresse inicial pela liberação de CRH, há uma estimulação da hipófise com uma liberação de hormônio (ACTH) e posterior ação na glândula adrenal para a ativação da liberação de glicocorticóides levando aos seus efeitos periféricos e centrais. Entretanto, há uma via hipotalâmica que recebe inervação de CRH no núcleo arqueado, inibindo neurônios produtores de neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo derivado do gene da cutia (AgRP) que são estimuladores do comportamento alimentar (Yam et al. 2017).

Especula-se que no modelo de estresse precoce, o LBN, haja uma modificação do comportamento alimentar palatável, visto que a anedonia mostrou-se evidente nos estudos citados anteriormente com chocolate e cocaína (Bolton et al. 2018).

#### **1.4 Comportamento alimentar e Anedonia em animais LBN**

A anedonia é uma diminuição da capacidade de sentir ou demonstrar prazer

frente a situações comumente prazerosas. Em ratos pode-se testar este aspecto avaliando características comportamentais no teste de preferência a sacarose, onde os animais geralmente ingerem maior quantidade de água açucarada. Quando há uma diminuição desta característica há uma associação com anedonia. Junto disso, drogas psicoativas como a cocaína, e ou o comportamento social dos animais jovens é associado à hedonia. Os animais LBN, já na puberdade exibem diminuição da preferência à sacarose e do comportamento de brincar demonstrado pelos estudos de Bolton et al. 2017. Em uma tarefa para obtenção de concentrações crescentes de cocaína, os animais LBN adultos tendem a diminuir sua motivação na busca da droga mediante toque em alavanca, o que foi explicado como um quesito anedônico relacionado aos animais estressados precocemente no período neonatal (Bolton et al. 2018). Estas ações são possivelmente moduladas por um aumento na conectividade da amígdala (Ag) com o córtex pré-frontal (CPF), vias estas relacionadas a medo e ansiedade (Bolton et al. 2017 & 2018). O comportamento frente a alimentos palatáveis envolve vias hedônicas e homeostáticas. E, sabe-se que o estresse precoce pode alterar e de alguma forma programar estas vias ao longo da vida, permitindo uma maior vulnerabilidade a transtornos alimentares (Sanchez et al. 2021).

A partir destes aspectos, hipotetiza-se duas possibilidades: (i) os animais estressados precocemente por meio do modelo de LBN possuam uma modificação no comportamento alimentar (para cereais doces: Froot Loops) por meio do teste do corredor, consumindo menor quantidade em gramas devido à uma possível anedonia; e (ii) quando submetidos ao comportamento alimentar após estresse agudo que consumam maior quantidade de alimento doce.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o comportamento alimentar hedônico através do teste do consumo de alimento palatável antes e após um estímulo de estresse agudo em ratos submetidos ao modelo animal de ninho empobrecido (LBN) e comparar as diferenças comportamentais entre machos e fêmeas.

### **2.1 Objetivos específicos**

2.1.1. Avaliar o comportamento alimentar na tarefa do corredor em ratos machos e fêmeas, de 70 dias, submetidos ao estresse de ninho empobrecido no período neonatal;

2.1.2. Avaliar o comportamento alimentar na caixa moradia após um estresse agudo em ratos machos e fêmeas, de 90 dias, submetidos ao estresse de ninho empobrecido no período neonatal;

2.1.3. Avaliar o peso corporal e consumo alimentar em gramas dos ratos, machos e fêmeas, de 21, 70 e 90 dias de vida, submetidos ao estresse de ninho empobrecido no período neonatal.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

**3.1 Animais:** foram utilizadas 14 ratas Wistar prenhes, primíparas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, randomicamente selecionadas. As ratas permaneceram no Biotério do Departamento de Bioquímica (UFRGS), individualmente, em caixas-moradia, confeccionadas de polipropileno com as dimensões de 40cm x 33cm x 17,8 cm de altura recobertas por tampas elevadas de arame de ferro carbono perfilado, com tratamento de zincagem e eletropolimento. O assoalho da caixa foi recoberto de maravalhas, e foram mantidas em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , limpeza das caixas uma vez por semana, água e ração padrão *ad libitum*. As ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes (no máximo 24h após o nascimento).

O total de 56 filhotes foram utilizados no estudo. As ninhadas foram divididas em 4 grupos: 2 controles (macho e fêmea) que permaneceram sem nenhum tipo de manipulação até o desmame, e 2 submetidas ao procedimento de ninho empobrecido (macho e fêmea). Foram utilizados no máximo 2 animais de cada ninhada nos experimentos comportamentais para evitar o viés de ninhada. Desta forma os grupos foram caracterizados abaixo:

**Controles:** deixados intocados até o desmame / Machos=13 Fêmeas=15;

Aprovação CEUA/UFRGS (número 40338) (Anexo 1).

### 3.2 Ninho empobrecido: Machos=16 e Fêmeas=12.

O protocolo de LBN segue o descrito por Bolton et al. 2018 e 2019 (adaptado). Inicialmente foi colocada uma toalha de papel para que a mãe possuísse algum subsídio para formação do ninho. Contudo, neste protocolo não houve maravalha nas caixas. Este aspecto se deu do dia 2 ao dia 9 de vida dos filhotes, sendo o dia do nascimento considerado o dia zero. Do momento do nascimento dos animais até atingirem 21 dias, a limpeza das caixas moradias de ambos os grupos de animais foi efetuada sempre pelo mesmo pesquisador, e nas ninhadas controles a maravalha suja foi substituída por maravalha limpa, com cuidado para que houvesse o menor contato possível com as ninhadas (filhotes e mãe). As trocas de toalhas de papel dos animais LBN, foram realizadas a cada dois dias, como descreve Bolton et al. 2018 e 2019. Após o período de ninho empobrecido, os animais foram mantidos no biotério com maravalha nas caixas até atingir 21 dias quando ocorreu o desmame e a sexagem. Os animais do mesmo sexo foram mantidos na mesma caixa (No máximo  $n=6$ /caixa ou o número de irmãos obtidos na ninhada do mesmo sexo/ninhada), em ambiente controlado até atingirem 60 dias quando foram randomizados. Dez dias depois os testes comportamentais foram realizados.



Figura 1. Limpeza das caixas  
Fonte: Elaborada pelo autor



Figura 2. Protocolo LBN  
Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.3 Teste do corredor: comportamento alimentar

Aos 70 dias de vida dos animais, foi avaliado o consumo de alimento palatável, o cereal doce Froot Loops Kellog's®. O protocolo usado foi descrito por Silveira et al. 2010, conforme segue: os animais foram colocados em uma caixa retangular

iluminada (40 cm - 15 cm - 20 cm) com piso e paredes laterais de madeira e teto de vidro. A caixa comportamental possui estas medidas padronizadas para que o animal consiga aprender que ao final do corredor há a recompensa doce, sem que haja distrações devido ao curto tempo de análise. Dez unidades de Froot Loops (Kellogg's) foram colocados em uma extremidade da caixa e os animais foram habituados a esse tipo de alimento durante 5 dias, sendo que neste período estavam em restrição alimentar para que estejam motivados a ingerir o cereal doce e a partir disso permita que o aprendizado se instale (recebendo 80% do consumo regular de ração padrão). No sexto dia foi realizado o teste, com os animais alimentados, tendo recebido ração padrão à vontade nas 24 horas anteriores. O teste ocorre com os animais alimentados para verificação do padrão de consumo de alimento doce referente a um componente hedônico, e não homeostático. O aparato foi limpo com uma pequena quantidade de álcool 30% entre os animais e de 70% para troca de diferentes sexos.

A quantidade de alimento ingerido, bem como a latência para provar o alimento, em restrição alimentar e no estado alimentado, foram avaliadas durante 3 minutos.



Figura 3. Teste do corredor  
Fonte: Elaborada pelo autor



Figura 4. Teste do corredor  
Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.4 Avaliação da resposta alimentar ao estresse agudo

Aos 90 dias de vida, com os animais alimentados, foram avaliadas as diferenças comportamentais entre grupo controle e LBN quanto a resposta alimentar a um ambiente estressor. O estresse foi utilizado visando alterar a ingestão de alimentos em condições de saciedade. Os animais foram submetidos a quatro sessões de 3

segundos de choque de 0,6 mA em uma câmara de choque. Os ratos foram então devolvidos às suas caixas moradia, sozinhos, para que logo após fosse realizado o teste de resposta alimentar com oferecimento de froot loops *ad libitum* por 10 minutos . Foi registrada a quantidade (em gramas) de froot loops consumida nesse tempo. Após 24 horas os animais foram submetidos novamente ao teste de resposta alimentar nas mesmas condições. Este protocolo foi descrito por Boggiano et al. 2007.



Figura 5. Avaliação do consumo na caixa moradia

Fonte: Elaborada pelo autor

### **3.5 Avaliação do peso corporal dos animais**

Os animais foram pesados aos 21, 70 e 90 dias de vida, bem como durante e após a tarefa da resposta alimentar, e ao final do último experimento comportamental. A quantidade de ração padrão consumidas foi mensurada em gramas semanalmente no período de 90 dias.

Todos os experimentos estão sumarizados na figura da linha do tempo abaixo:



Figura 6: Linha de tempo dos experimentos segundo o protocolo LBN.

### 3.6 Averiguação do ciclo estral

O ciclo estral das ratas foi averiguado no dia de ambos os testes, tanto no 6º dia do teste do corredor onde foi medido o comportamento alimentar bem como no primeiro dia de teste com choque nas patas. O procedimento foi realizado com a inserção de 50µL de solução salina 0,9% na cavidade vaginal, e a posterior coleta do material para uma lâmina de microscopia. O esfregaço foi observado em microscópio óptico e as fases do ciclo anotadas para posterior análise estatística. Foram determinadas as fases do ciclo estral segundo os estudos de Marcondes, et al. 2002 e Paccola, et al. 2013, em que consistiam nas características: (i) proestro com predominância de células epiteliais nucleadas com aspecto glandular; (ii) estro com presença de células epiteliais superficiais que geralmente são anucleadas; (iii) metaestro com o aparecimento de leucócitos junto de células nucleadas e anucleadas; e (iv) diestro com o predomínio de leucócitos no esfregaço, sem presença de células da mucosa aparentes (Marcondes et al. 2002; Paccola et al. 2013).

## 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado o teste de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para dados normais foi realizada a ANOVA de duas vias de medidas repetidas para analisar os dados do tempo de latência para chegar ao alimento palatável, tempo de latência para iniciar a comer o alimento e quantidade de alimento consumida (g) nos 5 dias de treino do teste do corredor. Para avaliar o tempo de latência para chegar ao alimento

palatável, tempo de latência para iniciar a comer o alimento e quantidade de alimento consumida (g) no sexto dia, chamado dia do teste, utilizou-se a ANOVA de duas vias. Na avaliação da resposta alimentar ao estresse agudo logo após e 24 horas depois do estresse por choque nas patas utilizou-se a ANOVA de duas vias de medidas repetidas. A análise dos resultados do peso corporal dos ratos durante os 90 dias de duração do protocolo foi realizada através do teste de ANOVA de medidas repetidas, bem como do consumo de ração padrão que foi mensurada semanalmente durante os 90 dias. Em todas as análises os parâmetros “grupo e sexo” foram apontados como fatores.

A relação das fases do ciclo estral nos testes de comportamento alimentar das ratas foi analisada pelo teste de ANOVA de uma via.

O teste *pos hoc* usado, quando necessário, foi o teste de Bonferroni.

O Software Spss® versão 22 foi utilizado para o cálculo estatístico, e o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Teste do corredor: comportamento alimentar

Os resultados indicam que, na análise da latência para chegar ao alimento palatável no teste do corredor (Figura 7), durante as sessões de treino (Figura 7A), não houve diferença significativa ao longo do tempo [ $F(4, 457,705) = 1,769$ ;  $P = 0,150$ ]. Entretanto, no dia do teste (Figura 7B), quando os animais estavam saciados, houve diferença entre os sexos [ $F(1, 166,662) = 4,027$ ;  $P = 0,050$ ] no tempo de latência para chegar ao final do corredor. As fêmeas do grupo controle chegaram mais rápido ao alimento doce do que os machos do grupo controle ( $P = 0,042$ , ANOVA de duas vias/Bonferroni). Considerando os resultados do parâmetro latência para comer, nas sessões de treino (Figura 7C) não houve diferença significativa [ $F(4, 208) = 1,418$ ;  $P = 0,229$ ]. Já no dia do teste (Figura 7D), com os animais saciados, houve diferença significativa entre os grupos no tempo de latência para comer o alimento doce. Os animais de ambos os sexos, submetidos ao protocolo LBN, levaram mais tempo para iniciar a comer o alimento doce [ $F(1, 10034,83) = 5,564$ ;  $P = 0,022$ ].

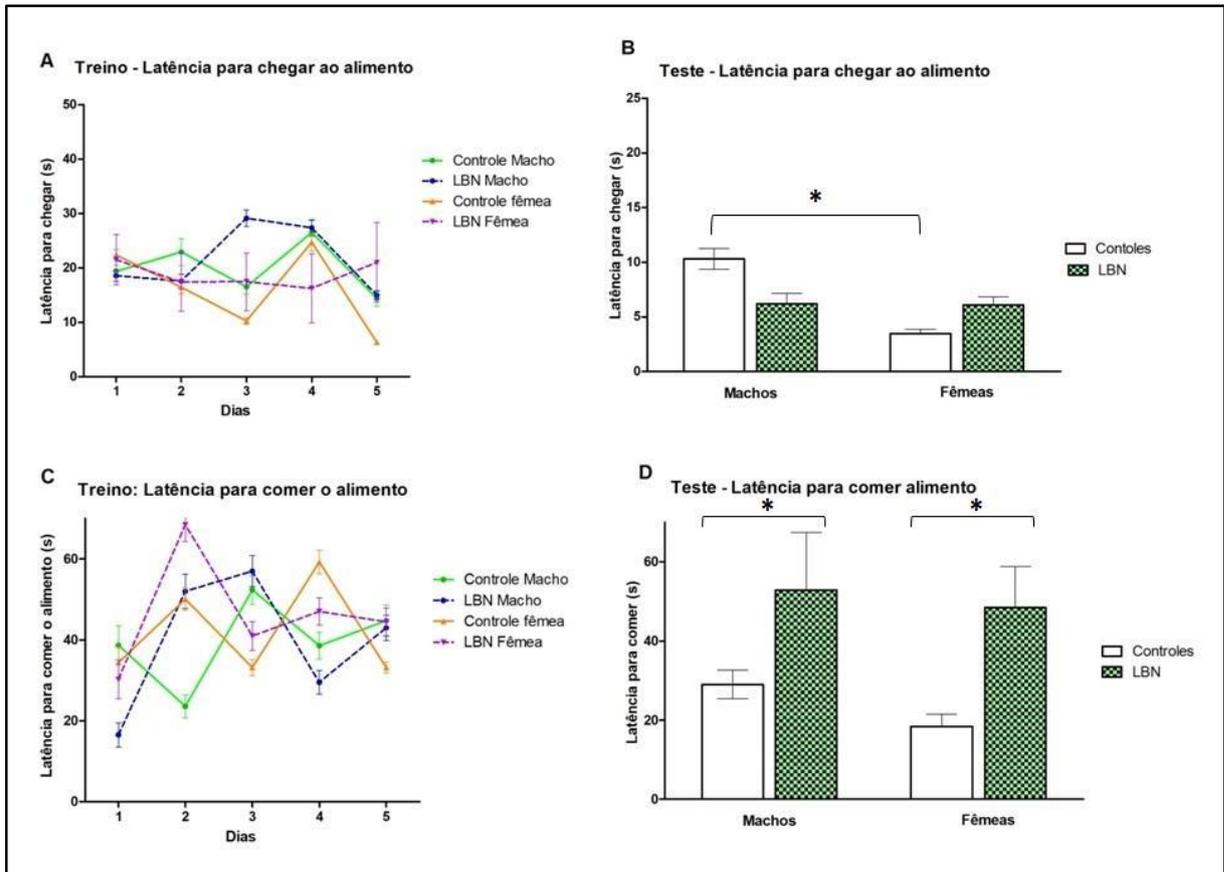


Figura 7. Efeito do modelo animal de LBN no tempo de latência para chegar ou comer o alimento palatável doce no teste do Corredor em ratos machos e fêmeas. (A) Tempo de latência (s) para chegar ao alimento, durante os cinco dias de treino, com os animais em restrição alimentar de 20% ( $P > 0,05$ , ANOVA de duas vias de medidas repetidas). (B) Tempo de latência (s) para chegar ao alimento no dia do teste (sexto dia) com os animais saciados.  $*P < 0,05$ , ANOVA de duas vias/Bonferroni. (C) Tempo de latência (s) para comer o alimento, durante os cinco dias de treino, com os animais em restrição alimentar de 20%.  $P > 0,05$ , ANOVA de duas vias de medidas repetidas). (D) Tempo de latência (s) para comer o alimento no dia do teste (sexto dia) com os animais saciados.  $*P < 0,05$ , ANOVA de duas vias/Bonferroni. Valores expressos como média (s)  $\pm$  erro padrão, (Machos: N= 13 controles, N=16 LBN; Fêmeas: N= 15 controles, N=12 LBN). Em todas as análises os parâmetros “grupo e sexo” foram apontados como fatores.

A Figura 8A demonstra que houve um aumento do consumo de alimento palatável ao longo das sessões durante os dias de treino [ $F(3,103, 161,380) = 30,060$ ;  $P < 0,0001$ ], verificando-se um efeito do sexo em que as fêmeas do grupo LBN consomem maior quantidade de alimento doce palatável do que os machos do grupo LBN ( $P = 0,024$ , ANOVA de duas vias de medidas repetidas/Bonferroni). No dia do teste (Figura 8B) observou-se novamente que houve diferença entre os sexos [ $F(1,$

2,458)=10,257;  $P=0,002$ ]. O grupo controle das fêmeas consumiu maior quantidade de alimento doce ( $P=0,003$  Anova de duas vias/Bonferroni) em relação ao grupo controle dos machos e novamente os grupos LBN macho e fêmea também diferiram ( $P=0,011$ , ANOVA de duas vias/Bonferroni).

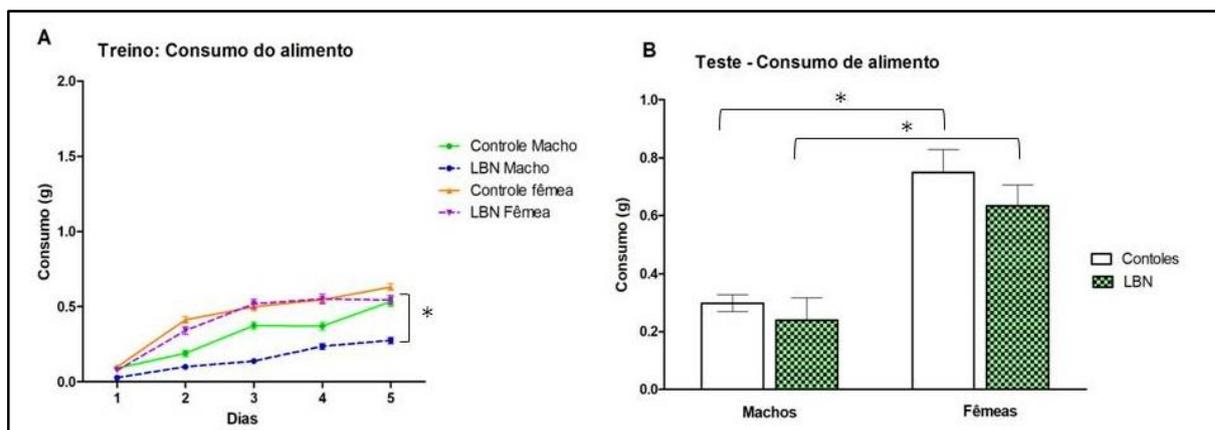


Figura 8. Efeito do modelo animal de LBN no consumo de alimento palatável doce em ratos machos e fêmeas. (A) Consumo (g) de alimento doce palatável, durante os cinco dias de treino, com os animais em restrição alimentar de 20%.  $*P<0,05$ , ANOVA de duas vias de medidas repetidas/Bonferroni entre machos e fêmeas do grupo LBN. (B) Consumo (g) de alimento doce palatável no dia do teste (sexto dia) com os animais saciados.  $*P<0,05$ , ANOVA de duas vias/Bonferroni entre machos e fêmeas do grupo controle e LBN, respectivamente. Valores expressos em média (g)  $\pm$  erro padrão, (Machos:  $N=13$  controles,  $N=16$  LBN; Fêmeas:  $N=15$  controles,  $N=12$  LBN).

## 5.2 Avaliação da resposta ao estresse agudo no comportamento alimentar

A avaliação do consumo de alimento doce palatável logo após o choque nas patas e 24 horas depois (Figura 9) demonstrou que houve diferença significativa entre os grupos [ $F(1,5,595)=4,069$ ;  $P=0,049$ ], e uma interação Grupo\*Sexo, [ $F(1,6,802)=4,947$ ;  $P=0,030$ ] onde os machos quando submetidos ao modelo de LBN consomem mais alimento doce logo após o choque, bem como 24 horas após ( $P=0,021$ , ANOVA/Bonferroni). Observou-se diferença entre os sexos [ $F(1,24,226)=17,620$ ;  $P<0,001$ ], onde o grupo controle das fêmeas ingere maior quantidade de alimento doce quando comparadas ao grupo controle dos machos ( $P<0,001$ , ANOVA/Bonferroni).

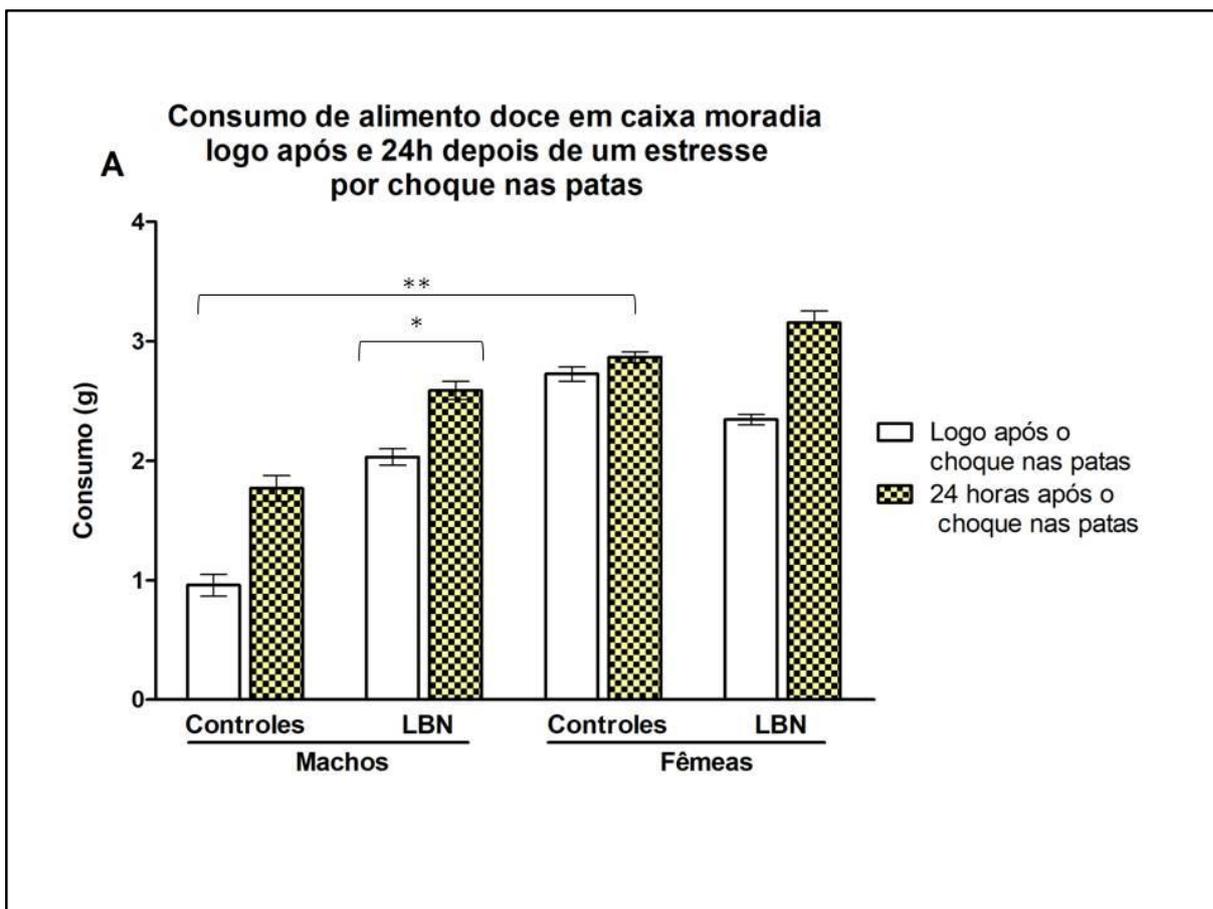


Figura 9. Efeito do estresse (choque nas patas) agudo e 24 horas após no consumo (g) de alimento doce palatável em caixa moradia dos ratos (machos e fêmeas) submetidos previamente ao modelo animal de LBN. Animais em restrição alimentar de 20%. \* $P < 0,05$ , Interação grupo\*sexo em relação ao grupo de machos LBN, ANOVA de duas vias de medidas repetidas; \*\* $P < 0,001$ , ANOVA de duas vias de medidas repetidas/Bonferroni em relação ao grupo de machos e fêmeas controle. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão, (Machos:  $N = 13$  controles,  $N = 16$  LBN; Fêmeas:  $N = 15$  controles,  $N = 12$  LBN).

### 5.3 Avaliação do peso dos animais e consumo de ração padrão ao longo da vida

Em ambos grupos (controle e LBN) e sexo (machos e fêmeas) houve um ganho de peso corporal [ $F(1,718, 68,737) = 6073,59$ ;  $P < 0,001$ ] durante o período de 90 dias (Figura 10). Neste mesmo período o ganho de peso das fêmeas foi menor quando comparadas aos machos [ $F(1,718, 67716,75) = 402,2016$ ;  $P < 0,001$ ]. Houve diferença entre os grupos, [ $F(1,718, 68,737) = 6,898$ ;  $P < 0,001$ ] onde os animais LBN ganharam menos peso ao longo do tempo, entretanto visualmente no gráfico as diferenças são percebidas em menor aspecto.

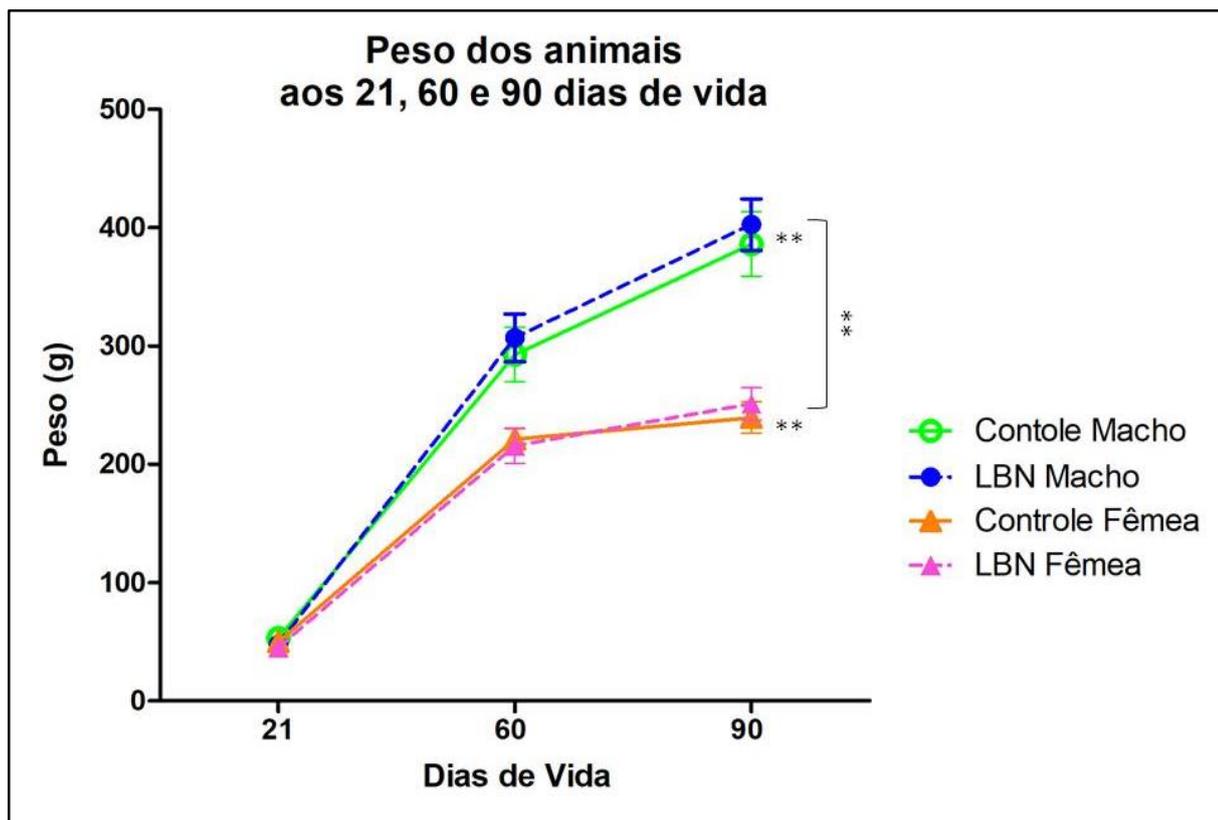


Figura 10. Peso corporal (g) de ratos machos e fêmeas ao longo do protocolo (90 dias). \*\*  $P < 0,001$  ANOVA de duas vias de medidas repetidas/Bonferroni entre machos e fêmeas do grupo controle e LBN, respectivamente. \*\*  $P < 0,001$ , ANOVA de duas vias de medidas repetidas/Bonferroni entre os grupos controle e LBN. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, (Machos:  $N = 11$  controles,  $N = 13$  LBN; Fêmeas:  $N = 10$ , controles,  $N = 10$ ).

Observou-se diferenças significativas no consumo de ração padrão durante as treze semanas (90 dias) de experimentos comportamentais (Figura 11). Da primeira semana de mensuração do consumo, isto é, após o desmame, até o final das treze semanas, percebeu-se um aumento do consumo já previsto com o crescimento dos animais [ $F(3,825, 103,265) = 222,554$ ;  $P < 0,001$ ]. Na avaliação das interações grupo\*sexo, observou-se que os animais machos ingerem maior quantidade de ração padrão em comparação com as fêmeas, ao longo do tempo [ $F(3,825, 103,265) = 19,267$ ;  $P < 0,001$ ]. Houve diferença entre os grupos, onde os animais LBN consomem menor quantidade de ração padrão ao longo do tempo mensurado, [ $F(3,825, 103,265) = 2,618$ ;  $P = 0,042$ ]. Junto disso, observou-se uma interação grupo\*sexo, onde fêmeas LBN ingerem a menor quantidade de ração padrão ao longo do tempo, [ $F(3,825, 103,265) = 2,896$ ;  $P = 0,028$ ].

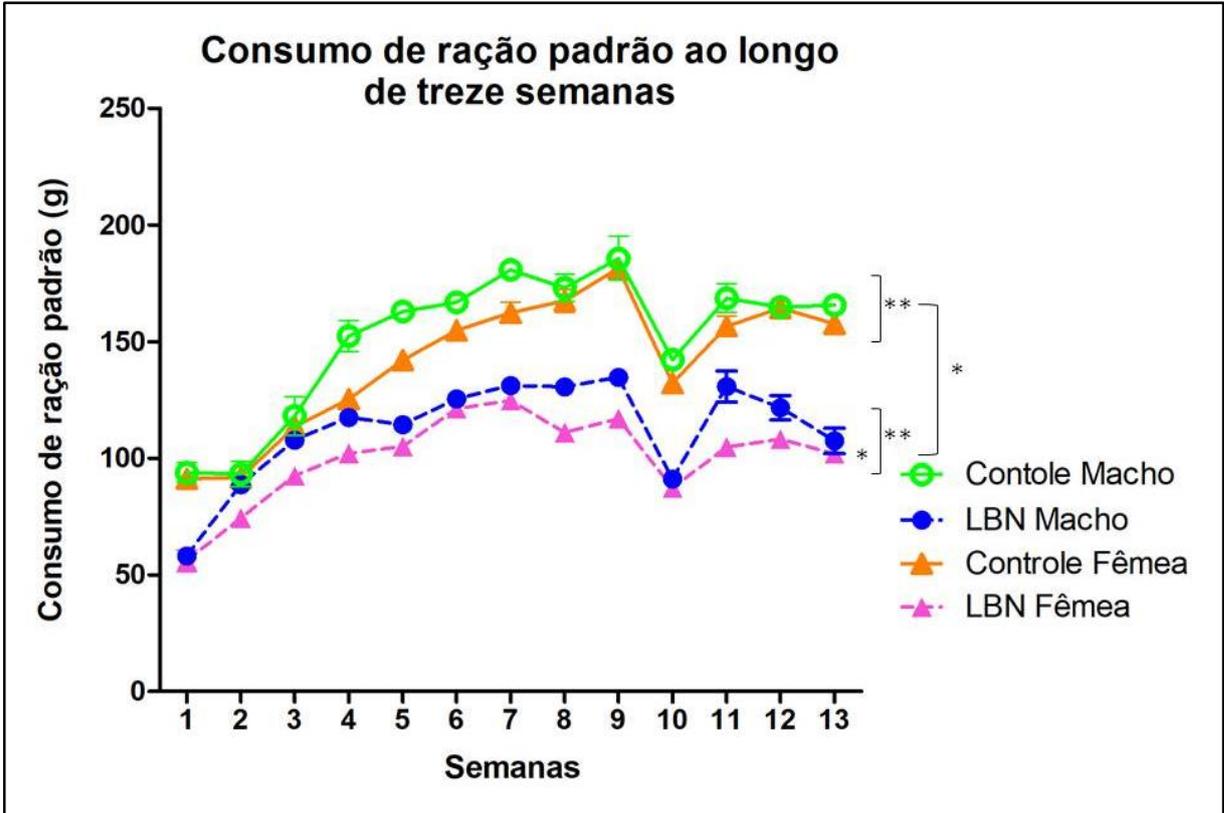


Figura 11. Consumo (g) semanal de ração padrão pelos ratos machos e fêmeas controles e LBN, durante o período de desenvolvimento do protocolo (13 semanas). \* $P=0,042$ , Teste ANOVA de medidas repetidas, diferença de grupo, entre controles e LBN; \* $P=0,028$ , Teste ANOVA de medidas repetidas, interação grupo\*sexo onde fêmeas LBN ingerem menor quantidade de alimento; \*\* $P<0,001$ , Teste ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni, entre machos e fêmeas do grupo controle e LBN, respectivamente. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, (Machos: N= 5 controles, N=10 LBN; Fêmeas: N= 8, controles, N=8).

### **5.3.1 Avaliação do consumo de ração padrão na terceira e quarta semana de vida dos animais (puberdade das fêmeas e machos respectivamente)**

Durante a terceira semana de vida dos animais (entre PND 35-40) foi avaliado especificamente, o consumo dos animais visto que é considerado o período da puberdade das fêmeas, (Figura 12). Junto disso, avaliou-se também pontualmente o consumo na quarta semana, (entre PND 42-47), momento este considerado a puberdade dos machos. Foi realizado o teste de ANOVA de duas vias em cada semana. Na terceira semana observou-se que uma diferença de grupo, onde animais LBN ingerem menor quantidade de ração padrão que controles, [F(1, 27)=11,676;P=0,002]. Ao mesmo tempo, percebeu-se uma diferença entre os sexos, em que fêmeas ingerem menor quantidade de ração em relação aos machos [F(1,27)=29,278; P<0,001]. No entanto, houve apenas uma tendência de interação grupo\*sexo [F(1,27)=3,352; P=0,078], sendo as fêmeas LBN com menor consumo neste ponto. E, na quarta semana, constatou-se as diferenças da semana anterior entre os grupos [F(1, 27)=68,750;P<0,001], entre os sexos [F(1, 27)=128,691;P<0,001, e interação grupo\*sexo, [F(1, 27)=5,029; P=0,033](Figura 12).

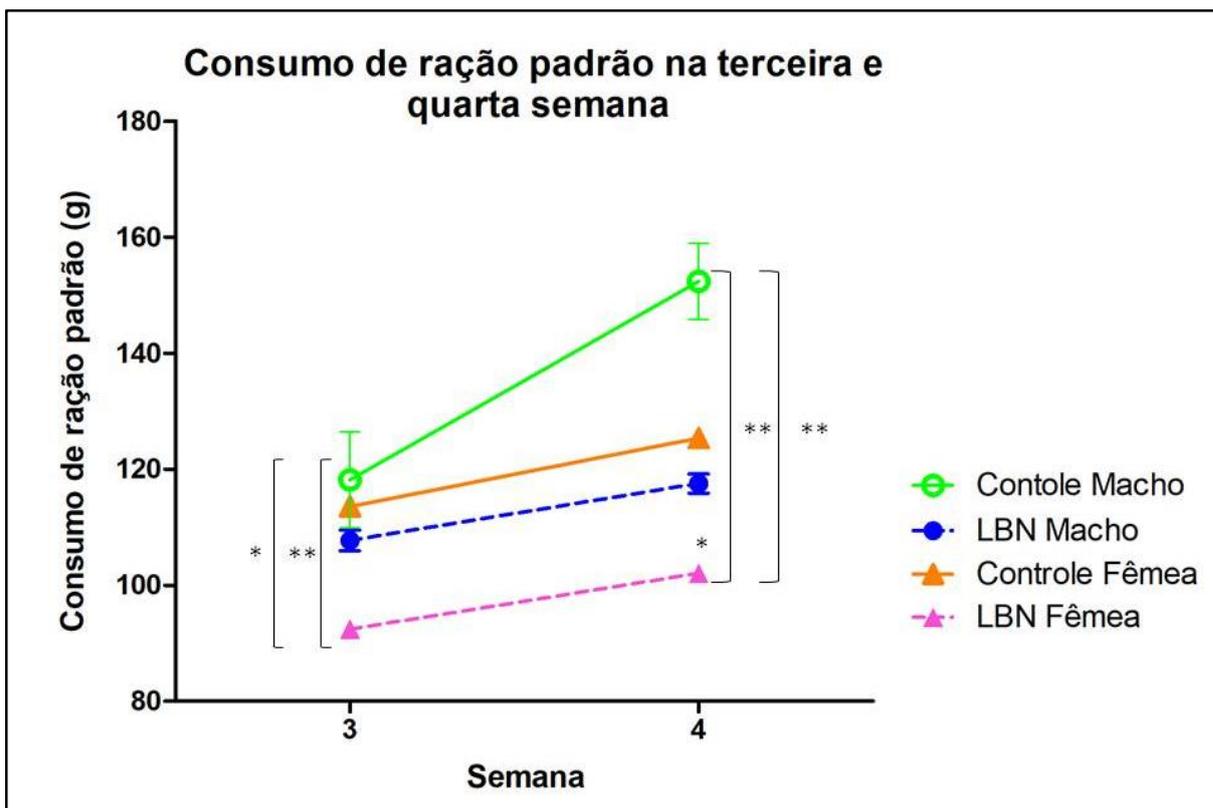


Figura 12. Consumo (g) de ração padrão na terceira e quarta semana de vida pelos animais fêmeas e machos controles e LBN, durante a puberdade, respectivamente. Na terceira semana, \* $P=0,002$ , ANOVA de duas vias, com diferença entre os grupos, onde animais LBN consomem menos que seus controles; \*\* $P<0,001$ , diferença entre os sexos, em que fêmeas consomem menos que os machos. Na quarta semana, \*\* $P<0,001$ , ANOVA de duas vias, com com diferença entre os grupos, onde animais LBN consomem menos que seus controles; \*\* $P<0,001$ , diferença entre os sexos, em que fêmeas consomem menos que os machos; \* $P=0,033$ , com interação grupo\*sexo, onde fêmeas LBN consomem menor quantidade de alimento.

## 5.4 Avaliação do ciclo estral como fator interferente nos testes comportamentais

### 5.4.1 Ciclo estral e teste do corredor: comportamento alimentar

Foi verificada a fase do ciclo estral, proestro, estro, diestro e metaestro, no sexto dia do teste do corredor, sendo as fases do ciclo consideradas como fatores no teste para avaliação de uma possível interferência. Em ambos os parâmetros, (i) latência para chegar ( $P=0,804$ ), (ii) latência para comer ( $P=0,987$ ) e (iii) quantidade de alimento consumido ( $P=0,726$ ), não observou-se diferença significativa das fases do ciclo como fatores, respectivamente. Dados não mostrados.

#### 5.4.2 Ciclo estral e avaliação da resposta alimentar ao estresse agudo

A análise do ciclo estral foi realizada no primeiro dia da resposta alimentar ao estresse agudo. Verificou-se que não houve diferença no comportamento alimentar referente às fases do ciclo das ratas,  $P=0,721$ . Dados não mostrados.

### 6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o modelo de estresse de ninho empobrecido (LBN) possui efeitos de maneira sexo específicos sobre o comportamento alimentar tanto no teste do corredor, bem como em caixa moradia após estresse agudo. Foi observado que frente a alimentos palatáveis, os cereais doces Froot loops Kelloggs®, as fêmeas tiveram uma menor latência para chegar no alimento, e consomem uma maior quantidade do cereal. Já na latência para comer, os animais submetidos ao protocolo LBN de ambos os sexos levam maior tempo para iniciar este comportamento. Nos resultados após o estresse agudo por choque nas patas, os animais machos do grupo LBN ingerem maior quantidade de alimento que seus controles, tanto imediatamente após quanto 24 horas depois do episódio agudo. E novamente, as fêmeas consomem maior quantidade de cereal doce em relação aos machos, independente de grupo, antes e depois do choque. Já com relação ao consumo de ração padrão ao longo das treze semanas de mensuração, as fêmeas ingerem quantidades inferiores aos machos. Junto disso, percebeu-se também um menor consumo de ração padrão pelos animais LBN em comparação aos seus controles.

As fêmeas demoram menos tempo para chegar ao fim do corredor no dia do teste, e consomem maior quantidade de cereal, sem interferência do modelo de LBN nos resultados. Este aspecto pode demonstrar uma maior motivação das fêmeas na busca por recompensas doces e conseqüentemente seu consumo. O estudo de Tapia, et al. 2019, corrobora com o presente trabalho, visto que foram analisados ratos machos e fêmeas da linhagem *Sprague-Dawley* em caixas operantes, treinados para conseguir *pellets* de sacarose mediante pressão em alavanca, bem como o seu consumo *ad libitum*. Verificou-se que as fêmeas possuem maior reforço (pressionam

mais vezes a alavanca) na tarefa que machos, quando submetidas a: (i) teste com tratamento farmacológico com morfina (substância que modula comportamentos de consumo palatável); e (ii) privação alimentar (Tapia, et al. 2019). O estudo de Gamaro, et al. 2003 aponta para a mesma direção, onde fêmeas adultas estressadas cronicamente e controles, ambas ovariectomizadas e suplementadas com estradiol ou veículo, ingeriram maior quantidade de alimento doce (Gamaro, et al. 2003). Indica-se também que recompensas alimentares podem ser divididas em dois aspectos, uma fração hedônica representativa do “gostar” controlada por mediadores opióides encefálicos e uma parcela que indica um elemento motivacional, do “querer” modulada por vias dopaminérgicas (Baldo et al. 2013, Barbano, et al. 2007, 2006; Berridge, et al.1996), contudo ambas vias não foram mensuradas ainda no presente trabalho. Junto disso, o estudo de Souza, et al. 2020, indica que os alimentos palatáveis são de maior escolha e consumo por fêmeas.

Ao que tudo indica, o modelo de LBN aparenta não causar grande impacto em fêmeas e hipotetiza-se que elas possam ser mais resilientes ao estresse precoce que os machos, neste protocolo. Contudo, Machado, et al. 2013, avaliou ratas submetidas ao estresse de LBN que exibiram ansiedade na vida adulta e hiper-reatividade do eixo HPA quando submetidas a um segundo desafio estressor, tendo aumento na ingestão de uma dieta palatável sob condições de livre escolha. Nesses animais, a preferência por alimentos palatáveis, calóricos e enriquecidos com açúcar/gordura pode decorrer do hábito de usar esse tipo de alimento para amenizar os efeitos negativos da exposição ao estresse (Machado, et al. 2013). Junto destes aspectos, quando fêmeas são submetidas a protocolos de estresse por privação materna, como descrito por Lima, et al., 2021, percebe-se que ocorre uma diminuição do consumo de alimentos palatáveis bem como do metabólito, ácido 5-hidroxi-indolacético (5HIAA) na amígdala (Lima, et al. 2021). Em concordância com esta ideia, Goodwill, et al., 2019 observaram que o estresse no início da vida leva a um comportamento do tipo depressivo e fenótipo anedônico em fêmeas. Esses resultados em conjunto sugerem que, fêmeas com privação materna tendem a consumir menos alimentos palatáveis (Goodwill et al., 2019). A partir destes dados, aponta-se que as fêmeas podem possuir maior motivação a alimentos doces bem como seu consumo, contudo o estresse por LBN não demonstrou afetar este comportamento.

No que se refere a latência para comer, os animais LBN, tanto machos quanto fêmeas levam maior tempo, no teste do corredor, para iniciar este comportamento. Esta condição parece estar relacionada ao ato do “querer” iniciar o comportamento consumatório, citado anteriormente, sendo este modulado por vias dopaminérgicas de cunho motivacional. Estas características poderiam estar relacionadas com uma possível anedonia levada por LBN. Este ponto é exibido no estudo de Bolton, et al. 2018, onde foi verificado o comportamento de auto-administração de cocaína mediante reforço por pressionamento de alavanca na tarefa denominada “*Behavior economic test*”. Nesta avaliação os animais necessitariam aumentar progressivamente seus esforços para conseguir as mesmas doses da droga infundida na corrente sanguínea, sendo considerado pelos autores um “preço a pagar”. Porém, o modelo de LBN diminuiu seu empenho e conseqüentemente o consumo. Junto disso, também diminuiu a ingestão de chocolate “M&Ms” fornecido livremente em caixa moradia.(Bolton, et al. 2018). Outro estudo que apontou efeitos anedônicos nos animais LBN machos, foi publicado por Kangas, et al. 2022, com a diminuição da ingestão de sacarose em teste de preferência, bem como a exposição dos animais a tarefa de recompensa probabilística. Esta última, que possui versão para humanos, indica o aprendizado acerca de recompensa em uma tela sensível ao toque, onde os animais devem distinguir linhas em comprimento, em *trials* de treino e teste sucessivos, e seus acertos são gratificados com leite condensado. Acertos diminuídos nesta tarefa estão associados a anedonia, em humanos e modelos experimentais (Kangas, et al. 2022). Este estudo pode estar correlacionado com os animais submetidos ao LBN avaliados neste trabalho, que parecem possuir menor resposta a recompensa palatável na motivação para comer.

Na tarefa do corredor, o aspecto motivacional corrobora com o fenótipo comportamental descrito por Bolton, pois devido ao maior tempo de latência para comer, contudo o consumo na tarefa não foi estatisticamente significativo no modelo de LBN, e o contrário foi percebido no consumo após o choque nas patas com aumento deste padrão.

No estudo de Bolton, et al. 2018, os animais submetidos ao protocolo LBN possuem modificações comportamentais e neuroquímicas de longo prazo, diante, por exemplo, de episódios prazerosos, como o comportamento social de brincar em ratos

jovens, e consumo de sacarose. Unido a isso, a atividade intrínseca da amígdala (Ag) mostra-se aumentada juntamente com suas conexões com o córtex pré-frontal (CPF), vias estas relacionadas a medo e ansiedade (Bolton et al. 2018).

No estudo de Sanchez, et al. 2021 que avalia a motivação na auto-administração de morfina, foi indicado que os animais do grupo LBN tiveram um menor *breakpoint*, isto é, um menor número basal de pressionamento da alavanca para obtenção de recompensa que seus controles. Além disso, os machos LBN possuem uma redução da frequência de potenciais excitatórios pós-sinápticos espontâneos no núcleo accumbens (Sanchez, et al. 2021). De acordo com o mesmo estudo, pode-se hipotetizar que os animais LBN do presente estudo também possuam menor motivação, no entanto apenas uma recompensa palatável foi testada, e as vias encefálicas ainda devem ser avaliadas.

O presente estudo apontou que um segundo evento estressor na vida de animais do grupo LBN promove um aumento do consumo alimentar, principalmente em animais machos quando comparado com os controles. O que se distingue dos resultados obtidos do teste do corredor, em que a diferença entre os grupos ocorreu apenas na latência para comer, com maior tempo para tal. Já as fêmeas corroboram seu comportamento em ambas tarefas, com maior consumo independente do estresse precoce. Entretanto, também pode-se indicar que as fêmeas, por já possuírem um alto consumo de alimento doce, precisem de maior tempo de avaliação do consumo, visto que hipotetiza-se que possa ter havido um efeito “teto”, e não foram verificadas diferenças por este motivo.

O estudo de Peña et al. 2019, comparou diferentes modelos de estresse precoce neonatal (separação materna, separação com redução de ninho, manipulação neonatal) em diferentes levas de camundongos machos, e após estabeleceu um segundo *hit* de estresse na vida adulta por derrota social. Foi verificada uma diminuição da preferência à sacarose em animais separados, e separados com ninho reduzido. O presente resultado indica, na tarefa comportamental com um segundo *hit* de estresse, um contraponto em relação a anedonia nos animais (Peña et al. 2019). Na mesma linha de raciocínio o estudo de Peña et al. 2017, realizou um estresse precoce por separação materna tardia (em torno de PND 10 a 20) em camundongos machos e um segundo *hit* por derrota social em animais adultos.

Foi verificado que, após o último estresse, os animais diminuíram a preferência a sacarose bem como exploração social perante outros animais, apresentaram um comportamento do tipo ansioso em campo aberto e tiveram maior imobilidade no teste de nado forçado. Junto disso, percebeu-se alterações na imunorreatividade do fator de transcrição *orthodenticle homeobox 2* (OTX2) na área tegmental ventral, que está presente em neurônios dopaminérgicos e auxilia no seu neurodesenvolvimento. Neste estudo o OTX2 foi correlacionado como uma assinatura transcricional de vulnerabilidade a comportamento do tipo depressivo. Este mesmo marcador não foi encontrado alterado no núcleo accumbens (Peña et al. 2017). Diante deste resultado, em comparação ao presente estudo, pode-se supor que os animais LBN submetidos a um segundo hit de estresse tenham características ansiogênicas (o que precisa ser testado), e esta característica aumentaria a chance do aumento do consumo de alimento doce, contudo a anedonia não mostra-se dentro desta hipótese.

Nosso estudo mostra que a relação entre peso e sexo nos animais são diferentes, onde fêmeas são mais leves em comparação aos machos. Em consonância com isso, houve diferenças significativas entre os grupos, em que os animais LBN possuem menor peso corporal que seus controles. O estudo de Pardo et al. 2022, analisou o ganho de peso corporal em roedores, para verificar os efeitos do modelo de LBN durante o desenvolvimento, infância, adolescência e na idade adulta. Observou-se que durante o desenvolvimento inicial os filhotes machos e fêmeas do grupo LBN reduziram o ganho de peso corporal. Durante o período da adolescência, o ganho de peso corporal de machos do protocolo LBN foi semelhante ao controle, mas em fêmeas do grupo LBN foi reduzido significativamente em relação ao controle. Durante o período adulto os machos e fêmeas LBN reduziram significativamente seu peso corporal em comparação com os controles. Esses resultados sugerem que os animais do modelo LBN possuem alteração no ganho de peso corporal dos filhotes de roedores. Animais LBN e machos, tiveram seu ganho de peso corporal reduzido durante o desenvolvimento inicial e no período adulto, mas não na adolescência. As fêmeas LBN reduziram seu ganho de peso corporal durante o desenvolvimento inicial, adolescência e idade adulta (Pardo et al. 2023). Junto disso, o estudo de White et al. 2019, mostra que o protocolo de LBN também causa redução similar no peso corporal em machos e fêmeas. Um dos achados é a redução do peso corporal, com padrão semelhante em ambos os sexos. Roedores machos e fêmeas mostram reduções

semelhantes no peso, diferenças importantes entre os sexos já estão presentes durante o período pós-natal inicial levantando a possibilidade de que mecanismos um tanto diferentes conduzam ao crescimento mais lento em filhotes machos e fêmeas expostos ao LBN (White et al. 2019).

A redução do peso corporal dos animais LBN, pode ser explicada pelo menor consumo de ração padrão ao longo das treze semanas de mensuração em ambos os sexos. Em concordância com isto, no período da puberdade de machos e fêmeas as diferenças deste parâmetro já estão presentes. Esta redução do consumo de ração padrão ao longo do tempo, concorda com o estudo de Lima, et al. 2020, que obteve resultados similares no modelo animal de privação materna, entretanto apenas em machos. Este ponto pode indicar que os animais estressados precocemente no presente estudo diminuíram seu consumo de ração padrão devido a aspectos homeostáticos, visto que este alimento não possui um potencial recompensador como o cereal doce. Este resultado da literatura foi explicado por um aumento do comportamento do tipo ansioso dos animais bem como o metabolismo de serotonina na região da amígdala (Lima, et al. 2020).

## **7. CONCLUSÕES**

Constatou-se neste trabalho, que o modelo animal de ninho empobrecido altera o comportamento alimentar frente a recompensas doces bem como ração padrão. Hipotetiza-se que uma possível anedonia esteja relacionada a este aspecto, contudo, após um segundo desafio estressor os animais LBN ingerem maior quantidade de alimento doce o que pode estar relacionado a um padrão ansiogênico. Estes comportamentos podem estar relacionados com as vias neuroquímicas de regiões como núcleo accumbens e córtex pré-frontal.

## **8. PERSPECTIVAS**

Neste trabalho notou-se a necessidade da continuidade do estudo da avaliação neuroquímica dopaminérgica e  $\mu$ -opióide em regiões encefálicas como o núcleo accumbens e córtex pré-frontal. Junto disso, para confirmar a anedonia ou menor motivação alimentar dos animais, percebeu-se a necessidade de realização dos testes comportamentais a seguir: (i) labirinto em cruz elevado ou teste claro- escuro e campo

aberto para avaliação do comportamento do tipo ansioso; (ii) preferência a sacarose; (iii) teste do nado forçado; e (iv) comportamento alimentar após um desafio farmacológico com agonista dopaminérgico, ex: metilfenidato. Desta forma, as hipóteses levantadas no presente trabalho poderão ser confirmadas corroborando com a literatura, ou indo em direção oposta.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baldo BA, Pratt WE, Will MJ, Hanlon EC, Bakshi VP, Cador M. Principles of motivation revealed by the diverse functions of neuropharmacological and neuroanatomical substrates underlying feeding behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Nov;37(9 Pt A):1985-98. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.02.017. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23466532; PMCID: PMC3910434.
2. Barbano MF, Cador M. Opioids for hedonic experience and dopamine to get ready for it. *Psychopharmacology (Berl).* 2007 Apr;191(3):497-506. doi: 10.1007/s00213-006-0521-1. Epub 2006 Oct 10. PMID: 17031710.
3. Bazhan NM, Iakovleva TV, Dubinina AD, Makarova EN. Impact of sex on the adaptation of adult mice to long consumption of sweet-fat diet. *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii.* 2020 Dec;24(8):844-852. doi: 10.18699/VJ20.682. PMID: 35087997; PMCID: PMC8763717.
4. Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996;20(1):1-25. doi: 10.1016/0149-7634(95)00033-b. PMID: 8622814.
5. Bolton JL, Short AK, Simeone KA, Daglian J, Baram TZ. Programming of Stress Sensitive Neurons and Circuits by Early-Life Experiences. *Front Behav Neurosci.* 2019 Feb 18;13:30. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00030. PMID: 30833892; PMCID: PMC6387907.
6. Bolton JL, Ruiz CM, Rismanchi N, Sanchez GA, Castillo E, Huang J, Cross C, Baram TZ, Mahler SV. Early-life adversity facilitates acquisition of cocaine self administration and induces persistent anhedonia. *Neurobiol Stress.* 2018 Jan 12;8:57-67. doi: 10.1016/j.ynstr.2018.01.002. PMID: 29888304; PMCID: PMC5991313.
7. Bolton J.L., Molet J., Regev L., Chen Y., Rismanchi N., Haddad E., Yang D.Z., Obenaus A. & Baram T.Z., Anhedonia following early-life adversity involves aberrant interaction of reward and anxiety circuits and is reversed by partial silencing of amygdala corticotropin-releasing hormone gene. *Biological Psychiatry* (2017), doi: 10.1016/j.biopsych.2017.08.023.
8. Chami R, Monteleone AM, Treasure J, Monteleone P. Stress hormones and eating disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 2019 Nov 1;497:110349. doi: 10.1016/j.mce.2018.12.009. Epub 2018 Dec 14. PMID: 30557597.
9. Claire-Dominique Walker, Kevin G. Bath, Marian Joels, Aniko Korosi, Muriel Larauche, Paul J. Lucassen, Margaret J. Morris, Charlis Rainekei, Tania L. Roth, Regina M. Sullivan, Yvette Taché & Tallie Z. Baram (2017) Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential, *Stress*, 20:5, 421-448, DOI: [10.1080/10253890.2017.1343296](https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1343296)
10. Cunha A, Dalle Molle R, Laureano DP, Reis AR, Corrêa C, Matte US, Silveira PP, Machado TD. "Comfort-foods" chronic intake has different behavioral and neurobiological effects in male rats exposed or not to early-life stress. *J Dev Orig Health Dis.* 2020 Feb;11(1):18-24. doi: 10.1017/S2040174419000291. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31169116.
11. de Lima RMS, Dos Santos Bento LV, di Marcello Valladão Lugon M, Barauna VG, Bittencourt AS, Dalmaz C, de Vasconcellos Bittencourt APS. Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific

- relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. *Behav Brain Res.* 2020 Feb 3;379:112399. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112399. Epub 2019 Nov 29. PMID: 31790781.
12. de Lima RMS, Barth B, Arcego DM, Krolow R, Silveira PP, Dalmaz C. Life-course effects of early life adversity exposure on eating behavior and metabolism. *Adv Food Nutr Res.* 2021;97:237-273. doi: 10.1016/bs.afnr.2021.02.003. Epub 2021 Mar 19. PMID: 34311901.
  13. de Souza, JA, da Silva, MC, de Matos, RJB, do Amaral Almeida, LC, Beltrao, LC, de Souza, FL, e cols. (2018). Prewaning maternal separation increases feeding later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine 1a and 2a receptors only in males. *Appetite*, 123,114–119. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.12.004>.
  14. Eck SR, Ardekani CS, Salvatore M, Luz S, Kim ED, Rogers CM, Hall A, Lee DE, Famularo ST, Bhatnagar S, Bangasser DA. The effects of early life adversity on growth, maturation, and steroid hormones in male and female rats. *Eur J Neurosci.* 2020 Jul;52(1):2664-2680. doi: 10.1111/ejn.14609. Epub 2019 Nov 24. PMID: 31660665; PMCID: PMC8027906.
  15. Gallo M, Shleifer DG, Godoy LD, et al. Limited Bedding and Nesting Induces Maternal Behavior Resembling Both Hypervigilance and Abuse. *Front Behav Neurosci.* 2019;13:167. Published 2019 Jul 25. doi:10.3389/fnbeh.2019.00167.
  16. Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, Dalmaz C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003 Sep;76(2):327-33. doi: 10.1016/j.pbb.2003.08.002. PMID: 14592685.
  17. Goodwill, H.L., Manzano-Nieves, G., Gallo, M. *et al.* Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. *Neuropsychopharmacol* 44, 711–720 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0195-5>.
  18. Ivy, A. S., Brunson, K. L., Sandman, C., and Baram, T. Z. (2008). Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience* 154, 1132–1142. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.019
  19. Kangas, B.D., Short, A.K., Luc, O.T. *et al.* A cross-species assay demonstrates that reward responsiveness is enduringly impacted by adverse, unpredictable early-life experiences. *Neuropsychopharmacol.* 47, 767–775 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01250-9>
  20. Kent MH, Jacob JC, Bowen G, Bhalerao J, Desinor S, Vavra D, Leserve D, Ott KR, Angeles B, Martis M, Sciandra K, Gillenwater K, Glory C, Meisel E, Choe A, Olivares-Navarrete R, Puetzer JL and Lambert K (2022) Disrupted development from head to tail: Pervasive effects of postnatal restricted resources on neurobiological, behavioral, and morphometric outcomes. *Front. Behav. Neurosci.* 16:910056. DOI:10.3389/fnbeh.2022.910056.
  21. Laguna A, Lajud N, Juárez J, Sanz-Martin A. Chronic early-life stress increases cognitive impulsivity and D2 immunoreactivity in the nucleus accumbens of adult rats. *Dev Psychobiol.* 2022 May;64(4):e22259. doi: 10.1002/dev.22259. PMID: 35452538.
  22. Leyrer-Jackson JM, Overby PF, Nagy EK and Olive MF (2021) Early Life Stress Promotes Heroin Seeking But Does Not Alter the Excitability of Insular

- Pyramidal Cells Targeting the Nucleus Accumbens. *Front. Behav. Neurosci.* 15:777826. doi: 10.3389/fnbeh.2021.777826
23. Machado TD , Dalle Molle R , Laureano DP , Portella AK , Werlang IC , Benetti Cda S , Noschang C , Silveira PP. ( 2013 ). Stress in early life is associated with anxiety, increased stress responsiveness, and preference for “comfort foods” at adult rates. *Stress*16: 549 – 56.
  24. Marcondes, F. K., F. J. Bianchi, and A. P. Tanno. "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations." *Brazilian journal of biology* 62 (2002): 609-614.
  25. Noschang C, Krolow R, Arcego DM, Laureano D, Fitarelli LD, Huffell AP, Ferreira AG, da Cunha AA, Machado FR, Wyse AT, Dalmaz C. The influence of early life interventions on olfactory memory related to palatable food, and on oxidative stress parameters and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus and olfactory bulb of female adult rats. *Neurochem Res.* 2012 Aug;37(8):1801-10. doi: 10.1007/s11064-012-0793-2. Epub 2012 May 10. PMID: 22573388.
  26. Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction (AR)*. 2013 Jul 26;10(4):677-83.
  27. Pardo GVE, Alfaro Saca EE, Becerra Flores CT, Delgado Casós WF, Pacheco-Otalora LF. Limited bedding nesting paradigm alters maternal behavior and pup's early developmental milestones but did not induce anxiety- or depressive-like behavior in two different inbred mice. *Dev Psychobiol.* 2023 Jan;65(1):e22357. doi: 10.1002/dev.22357. PMID: 36567650.
  28. Peña CJ, Nestler EJ and Bagot RC (2019) Environmental Programming of Susceptibility and Resilience to Stress in Adulthood in Male Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 13:40. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00040.
  29. Peña CJ, Kronman HG, Walker DM, Cates HM, Bagot RC, Purushothaman I, Issler O, Loh YE, Leong T, Kiraly DD, Goodman E, Neve RL, Shen L, Nestler EJ. Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science.* 2017 Jun 16;356(6343):1185-1188. doi: 10.1126/science.aan4491. PMID: 28619944; PMCID: PMC5539403.
  30. Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., and Baram, T. Z. (2008). A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology* 149, 4892–4900. doi: 10.1210/en.2008-0633
  31. Sanchez E, Bavley CC, Deutschmann AU, Carpenter R, Peterson DR, Karbalaei R, Flowers J 2nd, Rogers CM, Langrehr MG, Ardekani CS, Famularo ST, Bongiovanni AR, Knouse MC, Floresco SB, Briand LA, Wimmer ME, Bangasser DA. Early life adversity promotes resilience to opioid addiction-related phenotypes in male rats and sex-specific transcriptional changes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Feb 23;118(8):e2020173118. doi: 10.1073/pnas.2020173118. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 Apr 26;119(17):e2204210119. PMID: 33593913; PMCID: PMC7923376.
  32. Silveira PP, Portella AK, Assis SA, et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *International Journal of Developmental Neuroscience : the Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience.* 2010 Feb;28(1):111-118. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2009.08.018. PMID: 19744551.

33. Tapia, MA, Lee, JR, Weise, VN, Tamasi, AM e Will, MJ (2019). Sex differences in hedonic and homeostatic aspects of palatable food motivation. *Behavioral Brain Research*, 359, 396-400. doi:10.1016/j.bbr.2018.11.023
34. Van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front Cell Neurosci*. 2017 Apr 19;11:87. doi: 10.3389/fncel.2017.00087. PMID: 28469557; PMCID: PMC5395581.
35. Walker, Claire-Dominique, Kevin G. Bath, Marian Joels, Aniko Korosi, Muriel Larauche, Paul J. Lucassen, Margaret J. Morris, Charlis Raineke, Tania L. Roth, Regina M. Sullivan, Yvette Taché & Tallie Z. Baram (2017): Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential, *Stress*, DOI: 10.1080/10253890.2017.1343296.
36. White JD and Kaffman A (2019) The Moderating Effects of Sex on Consequences of Childhood Maltreatment: From Clinical Studies to Animal Models. *Front. Neurosci*. 13:1082. doi: 10.3389/fnins.2019.01082
37. Williams, A.V., Flowers, J., Coates, K.S. *et al*. Early resource scarcity alters motivation for natural rewards in a sex- and reinforcer-dependent manner. *Psychopharmacology* 239, 3929–3937 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00213-022-06264-9>.
38. Yam, K.Y., Ruigrok, S.R., Ziko, I., De Luca, S.N., Lucassen, P.J., Spencer, S.J., Korosi, A., Ghrelin and hypothalamic NPY/AgRP expression in mice are affected by chronic early-life stress exposure in a sex-specific manner. *Psychoneuroendocrinology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.09.006>.

## 10. ANEXO A



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 40338

Título: ESTRESSE PRECOCE DE NINHO EMPOBRECIDO: AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E MECANISMOS NEUROQUÍMICOS ENVOLVIDOS

Vigência: 01/03/2021 à 01/11/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MIRNA BAINY LEAL - coordenador desde 01/03/2021  
Jackeline Martins Eberhardt de Souza - desde 01/03/2021  
ROSANE GOMEZ - pesquisador desde 01/03/2021  
MARCELO DUTRA ARBO - pesquisador desde 01/03/2021  
Rachel Krolow Santos Silva Bast - pesquisador desde 01/03/2021

Equipe Externa:

Camilla Lazzaretti - pesquisador desde 01/03/2021  
Eliane Dallegrave - pesquisador desde 01/03/2021

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 12/07/2021 - Reunião via webconferência - Mconf UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de treze ratos Wistar, prenhas e sessenta e oito (68) ratos Wistar, neonatos, de ambos os sexos (34 fêmeas e 34 machos), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 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. Vigência do projeto de julho/2021 a novembro/2022.*

Porto Alegre, Segunda-Feira, 26 de Julho de 2021

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética