

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

Marina de Lima Marcolin

**ACESSO CRÔNICO À DIETA PALATÁVEL DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
AUMENTA A RESPOSTA AO ESTRESSE E ALTERA PREFERÊNCIA ALIMENTAR  
EM RATOS MACHOS ADULTOS**

PORTO ALEGRE

2014

Marina de Lima Marcolin

**ACESSO CRÔNICO À DIETA PALATÁVEL DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
AUMENTA A RESPOSTA AO ESTRESSE E ALTERA PREFERÊNCIA ALIMENTAR  
EM RATOS MACHOS ADULTOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Dalmaz

Porto Alegre

2014

## **Agradecimentos**

Aos ratos, sem os quais este trabalho não existiria, meus sinceros agradecimentos e grande respeito.

Ao pessoal do biotério do Departamento de Bioquímica, por toda a ajuda e cuidado com os animais.

Ao CNPq e à FAPERGS/PRONEX, pelo apoio financeiro tanto individual quanto ao projeto de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS, por ter me aceito e dado todo o suporte durante o mestrado. Ser aluna desse programa foi fundamental para minha formação profissional como cientista.

À UFRGS, que é meu segundo lar desde 2007 quando ingressei na graduação, pelo excelente ambiente acadêmico, estimulante e inspirador. Vou sentir falta daqui...

À minha orientadora, professora Carla Dalmaz, muito obrigada pela confiança, apoio, incentivo, paciência e ensinamentos. Foi um prazer ser sua aluna.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia do Estresse, em especial ao André, que foi meu braço direito em boa parte desse trabalho, e à Rachel, por todos os ensinamentos e ajuda desde que entrei no laboratório, quatro anos atrás.

Aos meus amigos da faculdade, Carla, Cícero, Dani, Dessa, Gabriel, Káren, Nani e Susi, obrigada por todo apoio e por desculparem minhas ausências durante esses dois corridos anos de mestrado. Vocês são a razão pela qual esses sete anos em Porto Alegre foram, sem sombra de dúvida, os melhores anos da minha vida.

Às minhas amigas que a Neuro me deu, Ana, Bruna e Rossana, vocês são a razão desse mestrado ter sido sensacional. Obrigada pelas conversas, risadas, ombro amigo nas horas de choro e desespero, saídas, estudos, apoio e companheirismo.

E à minha família, que sempre me apoiou, incentivou e deu forças para correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por me ensinar a me sentir em casa onde quer que eu esteja. Essa vida cigana não vai parar tão cedo, a saudade vai aumentar, mas, como diria o Caetano, é melhor que caminhar vazio.

## Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Lista de abreviaturas.....	3
I. Introdução.....	4
Obesidade.....	4
Comportamento alimentar.....	5
O hipotálamo.....	6
Leptina.....	8
Projeções do ARC.....	9
Comportamento alimentar e estresse.....	10
Manipulação neonatal, eixo HHA e comportamento alimentar.....	12
Sistema de recompensa.....	13
Objetivo.....	16
Objetivos específicos.....	16
II. Artigo.....	17
Abstract.....	17
1. Introduction.....	18
2. Materials and methods.....	20
2.1. Experimental design.....	20
2.2. Neonatal handling.....	21
2.3. High palatable diet.....	21
2.4. Food consumption and caloric efficiency.....	22
2.5. Experiments 1 and 2 – Feeding behavior task.....	23
2.6. Experiment 3 – Corticosterone curve.....	23
2.7. Biochemical analysis.....	24
2.8. Western Blot.....	24
2.9. Statistical analysis.....	25
3. Results.....	25
3.1. Body weight gain, adipose tissue and adrenal glands.....	26

3.2. Food consumption and caloric efficiency .....	26
3.3. Experiments 1 and 2 – Feeding behavior task.....	26
3.3.1. Consumption of Froot Loops® .....	26
3.3.2. Consumption of chocolate .....	27
3.4. Experiment 3 – Corticosterone curve.....	27
3.5. Biochemical analysis .....	28
3.6. Western blot.....	28
4. Discussion.....	29
5. References.....	31
III. Discussão e conclusão.....	47
Bibliografia .....	49

## Resumo

Intervenções precoces, como a breve separação de filhotes de suas mães, podem afetar permanentemente vários sistemas encefálicos que ainda não estão maduros, como o sistema de resposta ao estresse. Um modelo animal bastante utilizado para investigar essas intervenções é a manipulação neonatal. Os filhotes manipulados nas primeiras duas semanas de vida têm, quando adultos, menos medo e maior locomoção quando expostos a um ambiente novo e maior ingestão de alimentos palatáveis quando comparados com os animais não-manipulados. O consumo de alimentos palatáveis pode ter propriedades "reconfortantes" e ser consumido quando o animal é exposto a situações aversivas ou estressantes. Além disso, o aumento do consumo de alimento palatável está associado à obesidade, e consumo excessivo de alimentos doces pode estar relacionado a alterações nos circuitos de recompensa encefálico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre o consumo crônico de alimento palatável, e da interação entre essas duas intervenções sobre os sistemas encefálicos de resposta ao estresse e de recompensa. Ninhadas de ratos Wistar foram tratados (10 min/dia) ou não (grupo controle) entre os dias 1-10 pós-natais. Os machos dessas ninhadas foram divididos em dois subgrupos, recebendo ração padrão ou ração padrão + dieta rica palatável (enriquecida com carboidratos simples, feita de leite condensado) do dia 21 até o dia 61 pós-natal. Os ratos que receberam a dieta palatável consumiram mais alimento, mais calorias, ganharam mais peso, mas tiveram uma menor eficiência calórica do que os grupos de ração padrão. O acesso crônico à dieta palatável aumentou a resposta a um estressor agudo, a quantidade de gordura abdominal e níveis plasmáticos de leptina e triglicérides, e diminuiu a preferência a um novo alimento palatável. O consumo crônico de alimentos enriquecidos com carboidratos simples não pareceu ser capaz de mudar o sistema de recompensa desses animais, e a manipulação neonatal não teve efeito significativo sobre os parâmetros analisados. São necessários mais estudos para compreender como intervenções precoces e o tipo de dieta consumida durante o desenvolvimento afetam o cérebro e o comportamento, o que pode ajudar a elucidar os mecanismos subjacentes às alterações relacionadas a distúrbios alimentares.

## **Abstract**

Early life interventions, such as brief separation of pups from their mothers, may permanently affect several brain systems that are not yet mature, such as the stress response system. An animal model quite used to investigate these interventions is neonatal handling. Pups handled in the first two weeks of life have, as adults, less fear and increased locomotion when exposed to a new environment, and also an increased intake of palatable food when compared to non-handled animals. The consumption of high palatable foods may have “comforting” properties and may be consumed when the animal is exposed to aversive or stressful situations. Also, the increased consumption of highly palatable diets is associated with obesity, and overconsumption of sweet foods may be related to an altered brain reward circuits. The aim of this study was to evaluate the effect of neonatal handling on chronic palatable food consumption, and the interaction between these two interventions on stress response and reward system. Wistar rats were handled (10 min/day), or not (control groups), on days 1–10 after birth. Males from these groups were divided into 2 subgroups, receiving standard lab chow or standard lab chow + a highly palatable diet (enriched with simple carbohydrates, made from condensed milk) from postnatal day 21 to 61. Rats receiving the highly palatable diet consumed more food, more calories, gained more weight, but had a lower caloric efficiency than the standard chow groups. The chronic access to a highly palatable diet induced a higher response to an acute stressor, led to higher abdominal fat, plasma leptin and triglycerides, and also a lower preference for novel palatable food. The chronic consumption of food enriched with simple carbohydrates did not appear to be able to change the reward system of these animals, and the neonatal handling had no significant effect on most analyzed parameters. Further investigation is needed to understand how interventions and the type of diet eaten during development affect brain and behavior, which may help to elucidate the mechanisms underlying the alterations in brain and behavior related to eating disorders.

## **Lista de abreviaturas**

AgRP – peptídeo relacionado ao gene agouti  
ARC – núcleo arqueado hipotalâmico  
BHE – barreira hemato-encefálica  
CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina  
DMN – núcleo dorsomedial hipotalâmico  
GABA – ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
HHA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal  
LHA – área hipotalâmica lateral  
MCH – hormônio concentrador de melanocortina  
 $\alpha$ -MSH – hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanocortina  
NAc – núcleo accumbens  
NPY – neuropeptídeo Y  
POMC – pró-opiomelanocortina  
VMN – núcleo ventromedial hipotalâmico  
VTA – área tegmentar ventral



## **I. Introdução**

### **Obesidade**

A obesidade pode ser definida como um estado crônico de armazenamento excessivo de gordura corporal, que vai além das flutuações naturais causadas por mudanças na disponibilidade de nutrientes do ambiente (Berthoud & Morrison, 2008). Muitas são as causas atribuídas ao surgimento da epidemia de obesidade que se alastra por todo o globo (Gearhardt et al., 2012), mas as principais são a grande oferta e consumo de alimentos calóricos e palatáveis somados a um estilo de vida sedentário (Lindberg, Dementieva, & Cavender, 2011). Além de serem importantes fatores de risco para o desenvolvimento de obesidade, o consumo excessivo de alimentos e o sedentarismo podem levar à predisposição a diabetes, problemas cardíacos, hipertensão, entre outros (Das, 2010). Ainda que boa parte da população atingida pela obesidade seja adulta, é notável o número crescente de indivíduos obesos na faixa etária jovem e infantil, uma vez que esses fatores de risco estão presentes até mesmo antes do começo da vida escolar.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a obesidade em todo o mundo quase dobrou entre 1980 e 2008. Em 1980, 5% dos homens e 8% das mulheres no mundo eram obesos, e em 2008 esses índices chegaram a 10% e 14% respectivamente (WHO, 2012). Estimativas de 2008 apontam que mais de 1,4 bilhões de adultos com mais de 20 anos estavam acima do peso, ou 35% dessa população. Em 2012, mais de 40 milhões de crianças com menos de 5 anos estavam acima do peso ou obesa, e a prevalência de sobrepeso e obesidade infantil na idade pré-escolar é superior a 30%. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que a prevalência de obesidade na população adulta do país era de 12,7% em 2003 (PAHO/WHO, 2007).

Acompanhando o crescimento da obesidade pelo mundo, também cresceu o número de estudos e publicações na área. Se procurarmos em bancos de artigos científicos como o PubMed pela palavra-chave “obesity”, encontraremos mais de 200.000 resultados, sendo que em maio de 2014 haviam mais de 10.000 artigos). A busca com as palavras-chave “obesity children” nos fornece mais de 30.000 artigos

sobre o tema. Esses estudos abrangem os mais diversos aspectos da obesidade, desde mecanismos de controle da ingestão alimentar, vias encefálicas de recompensa e reforço de alimentos palatáveis, diferenças genéticas entre indivíduos magros e obesos até estratégias de tratamento em estudos clínicos. Começaremos, então, tratando sobre o primeiro aspecto, o comportamento alimentar.

### **Comportamento alimentar**

A obtenção de energia é uma das funções biológicas mais básicas na vida de qualquer ser vivo, dos microscópicos fitoplânctons até os grandes mamíferos. A maneira pela qual os organismos obtêm energia (por um metabolismo autótrofo ou heterótrofo) se diversificou ao longo da história evolutiva, mas o objetivo segue o mesmo: ter um aporte de energia o mais constante possível para poder realizar outras funções vitais, como crescimento e reprodução. Assim, os organismos se utilizam das mais diversas estratégias para buscar, obter, utilizar e armazenar fontes energéticas, de forma a manter um balanço energético positivo (Berthoud & Morrison, 2008).

Nos animais, os mecanismos que controlam a ingestão alimentar são bastante complexos, muitas vezes redundantes, mas extremamente confiáveis e eficazes (Berthoud & Morrison, 2008). Esses mecanismos incluem a demanda calórica do organismo e sinais metabólicos periféricos e centrais, compreendendo a parte homeostática ou fisiológica da ingestão alimentar, assim como aspectos hedônicos e cognitivos, também chamados de não-fisiológicos. Além disso, o controle da ingestão alimentar pode ser alterado por diferentes fatores ambientais, como a disponibilidade de nutrientes e o estresse (Ely et al., 1997).

Quando há um desequilíbrio entre esses dois sistemas (ex: os aspectos não-fisiológicos se tornam mais fortes do que os fisiológicos), pode haver o consumo de alimentos mesmo quando há saciedade, ou a interrupção da ingestão apesar da fome. Se essa situação persiste, surgem danos ao organismo, que podem culminar em distúrbios alimentares, tanto obesidade quanto anorexia. O balanço entre esses dois sistemas apresenta diferenças individuais entre os animais, variando conforme a experiência de vida, a herança genética, estado emocional e hábitos alimentares (Berthoud, 2007).

Se pensarmos em termos evolutivos, faz sentido que sejamos máquinas de procurar e lembrar onde achamos alimento, além de consumir e armazenar comida a nossa volta e em nossos corpos, uma vez que nossos antepassados viviam em ambiente com escassez de alimentos e sem perspectiva concreta de quando seria a próxima refeição. Assim, faz sentido também pensarmos que comer seja um ato tão prazeroso, que nos motive a querer e a trabalhar para obter mais, de modo similar às drogas de abuso, desencadeando comportamentos tipo-aditivos tanto em humanos quanto em animais de laboratório (Volkow, Wang, Tomasi, & Baler, 2013a). Os alimentos, especialmente os que contém açúcar, ativam os mesmos circuitos de recompensa encefálicos que as drogas de abuso, reforçando esse comportamento (Avena, Rada, & Hoebel, 2008). Porém, nos tempos modernos, com a ampla e constante oferta de alimentos altamente calóricos ricos em açúcares e gorduras, isso se torna um aspecto preocupante. A obesidade, então, poderia ser explicada por uma percepção inadequada dos sinais de saciedade estimulados com a ingestão alimentar, ou por um mal funcionamento dos mecanismos de recompensa.

### **O hipotálamo**

A estrutura encefálica chave para geração e regulação do comportamento alimentar é o hipotálamo. Essa pequena estrutura, localizada na base do encéfalo e nas proximidades do terceiro ventrículo, é formada por vários núcleos altamente interconectados, que produzem e secretam neuropeptídeos. Os principais núcleos envolvidos com a alimentação são o núcleo arqueado (ARC), a área hipotalâmica lateral (LHA), o núcleo paraventricular (PVN), o núcleo ventromedial (VMN) e o núcleo dorsomedial (DMN). O hipotálamo recebe sinais da periferia do corpo sobre o estado metabólico em que este se encontra, através de citocinas e hormônios secretados pelo tecido adiposo e por diversos órgãos do trato gastrointestinal (estômago, pâncreas, intestino), além de ser influenciado por sinais centrais, através da liberação de neurotransmissores, como dopamina, serotonina e opióides. Se a rede local do hipotálamo parece complexa, o quadro se complica ainda mais quando acrescentamos as aferências e eferências dessa estrutura. Todos esses sinais contribuem para a

manutenção (ou desregulação) do apetite e da homeostase energética (Zheng & Berthoud, 2008).

Os primeiros estudos que apontaram para o hipotálamo como sendo a estrutura chave no controle do comportamento alimentar (antes se achava que era a hipófise) foram feitos com estimulações elétricas e lesões em diferentes núcleos hipotalâmicos. Quando eram feitas lesões no núcleo ventromedial (VMN), os animais aumentavam a ingestão alimentar, desenvolviam resistência à insulina e se tornavam obesos, enquanto que estimulações elétricas nessa região causavam perda de apetite. Já lesões na área hipotalâmica lateral (LHA) causavam anorexia e adipsia (falta de sede) nos animais, enquanto que a estimulação elétrica desse núcleo estimulavam o apetite. Assim, surgiu o conceito dual do hipotálamo, com um centro de “fome” – a LHA – e um centro de “saciedade” – o VMN. Além disso, quando eram feitas interrupções das conexões entre esses dois núcleos com regiões vizinhas, os efeitos encontrados eram muito similares aos das lesões nos próprios núcleos (Abizaid & Horvath, 2008). Porém, estudos posteriores mostraram que, apesar da ideia inicial correta, o funcionamento desses dois centros dependia da atividade de outro núcleo hipotalâmico, o arqueado.

O núcleo arqueado (ARC) parece ser o principal regulador do comportamento alimentar. Ele possui dois grandes grupos de neurônios que produzem neuropeptídeos de funções opostas. Os neurônios orexígenos, ou seja, que estimulam a alimentação, produzem neuropeptídeo Y (NPY) e co-expressam peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP), e mandam projeções GABAérgicas para o outro grupo de neurônios do ARC, os anorexígenos. Estes neurônios, que inibem a alimentação, produzem pró-opiomelanocortina (POMC), um polipeptídeo que, quando clivado, produz, entre outras moléculas, o hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanocortina ( $\alpha$ -MSH), além de co-expressarem o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), também mandam projeções GABAérgicas para os neurônios orexígenos. Assim, o mecanismo chave para induzir ou não o comportamento alimentar parece ser qual desses dois grupos de neurônios é ativado primeiro (Mercer, Chee, & Colmers, 2011).

## Leptina

Diversas substâncias foram descritas como ativadoras dos neurônios do ARC. A primeira delas foi a leptina, um hormônio produzido e secretado pelo tecido adiposo em quantidade proporcional a ele. Roedores que apresentam mutações espontâneas no gene da leptina (chamados *ob/ob*) ou no seu receptor (*db/db*) apresentam fenótipo obeso e são hiperfágicos. Modelos animais nocaute para esses dois fatores trouxeram e ainda trazem muitas respostas de como a leptina influencia a atividade hipotalâmica (outros núcleos além do ARC apresentam receptores para leptina), bem como o consumo alimentar, o ganho de peso, acúmulo de gordura e recompensa (Abizaid & Horvath, 2005; Figuelewicz, 2003).

A leptina age sobre o ARC hipotalâmico, inibindo os neurônios orexígenos NPY e estimulando os neurônios anorexígenos POMC/CART, com consequente diminuição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (Leinninger, 2009). Sua função anorexígena acontece com baixos níveis circulantes, enquanto que a ausência de sinalização é um forte sinal para induzir a alimentação. Como a leptina é secretada de acordo com a quantidade de gordura corporal, seria de se esperar que indivíduos obesos secretassem grandes quantidades desse hormônio, o que de fato ocorre (Zhang & Scarpace, 2006). Porém, o que não se observa nesses indivíduos é a ação anorexígena da leptina, já que esses indivíduos fazem grande consumo de alimentos. A falta de ação da leptina parece não ser por uma deficiência em sua produção, mas por um quadro de resistência ao hormônio, de forma similar à resistência à insulina que ocorre nos diabéticos do tipo 2. Possíveis explicações para a resistência à leptina em indivíduos obesos incluem problemas na barreira-hemato-encefálica (BHE), que não permitiria a passagem do hormônio ao encéfalo, e/ou problemas na sinalização do receptor da leptina nos neurônios hipotalâmicos (Banks, 2006; Berthoud & Morrison, 2008). Além disso, a alta concentração de triglicerídeos circulantes com o consumo de dietas palatáveis parece contribuir para o bloqueio do transportador de leptina da BHE, contribuindo para o quadro de resistência a esse hormônio (Banks et al., 2004). Dessa forma, a resistência à leptina não impede o aumento da adiposidade ou o consumo excessivo de alimentos que se observa na obesidade, enquanto que a melhora da

sinalização da leptina promove diminuição da ingestão alimentar bem como um fenótipo magro resistente à obesidade (Morrison, 2008).

### **Projeções do ARC**

O principal alvo das projeções dos neurônios do núcleo arqueado, tanto os orexígenos quanto anorexígenos, parece ser o núcleo paraventricular (PVN), onde o NPY, AgRP e  $\alpha$ -MSH influenciam o consumo de alimentos bem como a temperatura corporal. Outras projeções emergem do ARC, dirigindo-se ao VMN, LHA e também ao núcleo dorsomedial (DMN). Este núcleo é um alvo direto dos neurônios NPY/AgRP, que também produz esses neuropeptídeos, especialmente durante a fase pós-natal e diminuindo na idade adulta (Mercer et al., 2011). O DMN parece ser importante na manutenção da hiperfagia em situações de demanda energética, sejam elas reais ou não. Além disso, o DMN manda projeções inibitórias para os neurônios POMC/CART do ARC.

Os neurônios da LHA produzem duas classes de neuropeptídeos orexígenos, a hipocretina/orexina e o hormônio concentrador de melanocortina (MCH). Ambos aumentam o apetite, mas por mecanismos diferentes. Os neurônios que produzem hipocretina/orexina mandam projeções para o ARC estimulando os neurônios NPY/AgRP que, por sua vez, mandam projeções estimulatórias de volta para esses neurônios, formando um circuito redundante que fortalece o sinal orexígeno, estimulando a busca de alimento em resposta a desafios energéticos. Já o MCH aumenta o apetite por uma via mais direta, ainda não tão bem elucidada. Além disso, os neurônios POMC/ $\alpha$ -MSH do ARC mandam projeções inibitórias para os neurônios MCH, impedindo o aumento do consumo alimentar (Abizaid & Horvath, 2008; Mercer et al., 2011).

Outros circuitos encefálicos são ativados e/ou recrutam os centros de controle alimentar comandados pelo hipotálamo. As vias dopaminérgicas mesolímbica e corticolímbica são algumas das mais estudadas. A depleção de dopamina suprime o consumo alimentar de forma similar às lesões hipotalâmicas discutidas anteriormente. Além disso, neuropeptídeos hipotalâmicos, como NPY, AgRP, hipocretina/orexina,  $\alpha$ -MSH e MCH modulam a atividade dopaminérgica através de projeções para o núcleo

accumbens (NAc), uma das estruturas-chave no sistema de recompensa e reforço encefálico.

O ARC hipotalâmico consegue modular tanto a atividade do NAc diretamente, quanto indiretamente por meio da área tegmentar ventral (VTA), via LHA com projeções de MCH e hipocretina/orexina. A VTA também é sensível à leptina e à grelina, fazendo com que esses hormônios periféricos consigam modular diretamente a atividade dopaminérgica. Outros neurotransmissores também influenciam a ingestão alimentar, como serotonina e opióides, regulando o tamanho da refeição, sua frequência, bem como o prazer e a motivação para comer. Vias do córtex pré-frontal relacionadas à atenção e ao alerta também modulam a atividade hipotalâmica, bem como a atividade da amígdala. A alimentação também é influenciada pela atividade locomotora do animal, seu estado de humor (o estresse pode tanto inibir quanto estimular o consumo), bem como os aspectos motivacionais de “querer” e “gostar”.

### **Comportamento alimentar e estresse**

O hipotálamo não controla apenas o consumo de alimentos e o gasto energético do organismo. Ele também faz parte de uma importante circuitaria de resposta a eventos estressores conhecido como eixo hipotálamo-hipófise adrenal (HHA). Este eixo é ativado juntamente com a divisão simpática do sistema nervoso autônomo, e promove diversas mudanças temporárias físicas, psicológicas e comportamentais no organismo, afetando, entre outros aspectos, o sistema imunitário, o metabolismo, o apetite e o comportamento alimentar (Chrousos, 2010; Tsigos & Chrousos, 2002).

A resposta ao estresse leva a alterações comportamentais e metabólicas, num esforço de manter a homeostasia corporal e aumentar as chances de sobrevivência. As alterações geradas vão depender do tipo do estresse, da intensidade, da duração e da idade do animal. A ativação aguda desses sistemas promove respostas clássicas de “luta ou fuga”, sendo altamente adaptativas. Nessas circunstâncias, a energia gasta em atividades rotineiras, como ingestão de alimentos, digestão e reprodução, deve ser direcionada a outras funções. Assim, parte da resposta estereotipada ao estresse agudo inclui a supressão do apetite e da ingestão de alimentos (Adam & Epel, 2007). Além disso, para lutar ou fugir, o organismo precisa de energia. Como consequência,

há uma mobilização de estoques energéticos através de glicogenólise, lipólise e catabolismo protéico, além do aumento da atenção e da vigilância, inibição da função gonadal, aumento da frequência de batimentos cardíacos e da pressão sanguínea, direcionamento do fluxo sanguíneo para órgãos-alvo (como cérebro, músculo esquelético e coração), para que o organismo supere a situação aversiva e continue vivo (Majzoub, 2006; Tsigos & Chrousos, 2002).

Entretanto, quando há uma exposição crônica a situações estressoras ou o controle inadequado das respostas ao estresse, ocorre um aumento nos níveis basais de glicocorticoides circulantes, podendo ser danoso ao organismo (Dallman et al., 2004; Miller & O'Callaghan, 2002). Esse aumento pode ser associado a dilatação ventricular, atrofia cerebral, redução na capacidade cognitiva e possível neurotoxicidade (Sapolsky, Romero, & Munck, 2000). Esses aumentos causam danos também ao hipocampo, levando a uma subsensibilização (*down regulation*) dos receptores de glicocorticoides nessa estrutura e prejudicando sua capacidade de controlar a retroalimentação negativa. Esse ciclo vicioso de eventos é referido como a “cascata dos glicocorticoides” (Sapolsky & Meaney, 1986).

Como dito anteriormente, o comportamento alimentar pode ser alterado por diversos estímulos ambientais, como situações estressantes. Estudos apontam relações importantes entre os níveis de corticosterona (principal hormônio em roedores de resposta tardia ao estresse) e a quantidade ingerida de soluções adoçadas, mostrando que os glicocorticoides alteram a preferência e o consumo de alimentos (Dallman et al., 2003). Dados como esses sugerem que os alimentos palatáveis possam apresentar propriedades “confortantes”, sendo consumidos pelo indivíduo quando exposto a uma situação aversiva ou estressante (Adam & Epel, 2007). Evidências também apontam que o consumo excessivo de açúcar possa estar relacionado aos circuitos encefálicos de recompensa, em que o núcleo accumbens parece ser a estrutura mais relevante. Quando estimulados, esses circuitos levariam a um consumo compulsivo de alimentos, que pode resultar em sobrepeso e obesidade (Adam & Epel, 2007; Figlewicz, Bennett-Jay, Kittleson, Sipols, & Zavosh, 2011).



## **Manipulação neonatal, eixo HHA e comportamento alimentar**

Outro aspecto bastante presente na vida de muitas crianças nas últimas décadas é a ausência dos pais, especialmente da mãe que, por diversos motivos, volta a trabalhar fora de casa enquanto o filho ainda é muito pequeno. Sabe-se que intervenções precoces, como a separação breve dos filhotes de suas mães, podem afetar, de forma permanente, diversos sistemas encefálicos ainda em formação, como os sistemas de resposta a eventos estressores, sendo de grande importância o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ou eixo HHA (Meaney & Aitken, 1985). Um modelo animal bastante utilizado para investigar os efeitos dessas intervenções é a manipulação neonatal. Estudos indicam que animais manipulados nas duas primeiras semanas de vida apresentam, na idade adulta, menos medo quando expostos a ambientes novos, maior atividade exploratória e maior consumo de alimentos palatáveis do que animais não manipulados, devido a uma menor resposta do eixo HHA ocasionada pela manipulação (Levine, Haltmeyer, Karas, & Denenberg, 1967; Silveira et al., 2004). A manipulação neonatal aumenta a expressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo e no córtex frontal, envolvidos na regulação da atividade do eixo HHA (Francis & Meaney, 1999), mas os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ocorrer devido a uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central ao mecanismo de retroalimentação negativa (Levine, 1994), que diminuiria a resposta desses animais a eventos estressantes.

Existem evidências de que a manipulação neonatal altera o comportamento alimentar dos animais na vida adulta. Dados do nosso laboratório sugerem que tanto a motivação para aproximar-se ou o impacto hedônico da recompensa representado pela comida saborosa podem ser afetados pelo ambiente neonatal (Silveira, Benetti, et al., 2006; Silveira et al., 2008; Silveira, Portella, Clemente, Gamaro, & Dalmaz, 2005). Ratos submetidos à manipulação neonatal apresentaram, na idade adulta, uma menor latência para consumir e maior consumo de alimento doce quando este foi oferecido por um curto período de tempo, tanto em aparato de comportamento alimentar quanto na caixa-moradia, sem que houvesse alteração no consumo de ração padrão. Este efeito é observado somente após a puberdade. Além disso, quando expostos

cronicamente a alimentos palatáveis, estes animais parecem ser menos vulneráveis aos efeitos metabólicos adversos de tal sobrecarga de açúcar e gordura. Assim, o maior consumo de alimento palatável parece ser devido ao seu efeito “confortante” (Benetti et al., 2007), sugerindo uma interação entre os circuitos de recompensa e o eixo HHA.

### **Sistema de recompensa**

O sistema de recompensa encefálico é composto por diversas estruturas, sendo as principais o núcleo accumbens (NAc) e o restante do estriado, córtex pré-frontal, pálido ventral, mesencéfalo (neurônios dopaminérgicos da substância nigra *pars compacta*, área tegmentar ventral e grupos de células retrorubrais), amígdala, tálamo, hipocampo e algumas outras estruturas de menor participação. Apesar de diversas estruturas e regiões constituírem esta circuitaria, as estruturas centrais parecem ser os neurônios dopaminérgicos do NAc e da área tegmentar ventral (VTA).

Neurônios dopaminérgicos que respondem a estímulos prazerosos (ex: alimentação) existem desde os invertebrados, como nematódeos e moluscos (Barron, Søvik, & Cornish, 2010). Esse sistema evoluiu para que comportamentos adequados e/ou vantajosos para a sobrevivência do animal fossem reforçados e realizados novamente, e esse reforço é percebido por uma “sensação” de recompensa. Assim, o aprendizado e a busca por recompensa são aspectos fundamentais do comportamento dos animais.

Alimentos palatáveis, também chamados “alimentos confortantes”, são uma recompensa natural e possuem propriedades motivadoras potentes, sendo inclusive utilizados em várias tarefas comportamentais como reforço. A ingestão de soluções de sacarose promove um aumento na liberação de dopamina não somente no núcleo accumbens, mas no córtex pré-frontal e hipotálamo, estruturas que estão relacionadas com o comportamento alimentar (Adam & Epel, 2007; Hajnal, Smith, & Norgren, 2004). Dados da literatura sugerem que é necessária a integridade das muitas vias de neurotransmissores para uma resposta adequada ao estímulo da presença de alimentos, como dopamina, serotonina e opióides (Blundell, 1991).

O impacto hedônico de um alimento palatável parece ser o aspecto mais importante para estimular o apetite e seu consumo (Berthoud, Lenard, & Shin, 2011). O prazer relacionada ao comer começa na boca, através da ativação de receptores gustatórios presentes na língua e cavidade oral. Esses mesmos receptores também são encontrados no epitélio intestinal e no hipotálamo, o que faz com que mesmo se retirando o paladar dos animais (através de manipulações genéticas dos receptores na boca apenas), eles ainda preferem beber solução com sacarose à água pura (de Araujo et al., 2008). Porém, o aspecto hedônico, ou “gostar” da recompensa, parece envolver mais o sistema opioide que o dopaminérgico (Berridge, 2009).

A dopamina parece estar envolvida com a motivação e o reforço da busca pela recompensa, ou com o “querer”. De maneira similar às drogas de abuso, há um aumento na liberação de dopamina pela VTA quando o animal entra em contato pela primeira vez com um alimento palatável, aumentando a atividade dos neurônios do NAc (Volkow et al., 2013b). Com a repetição do consumo, os neurônios dopaminérgicos da VTA disparam quando o animal é exposto a pistas ou estímulos que precedem/predizem o alimento, não mais durante o consumo do mesmo. Assim, a dopamina parece estar envolvida nas respostas de condicionamento ao alimento, induzindo a motivação quando a recompensa é concretizada. Do mesmo modo, quando o animal é exposto a pistas, mas não recebe o alimento, a liberação dopaminérgica diminui, levando à extinção do comportamento.

Neurônios da VTA e o NAc possuem receptores para diversos hormônios metabólicos secretados tanto pelo sistema digestivo quanto pelo SNC, como glucagon, insulina, leptina, grelina, orexina e melanocortina. Desta forma, esses hormônios não só controlam a ingestão alimentar em si quanto também podem agir diretamente sobre e influenciar a atividade do sistema de recompensa (Volkow, Wang, Tomasi, & Baler, 2013a). De uma maneira geral, sinais orexígenos aumentam a atividade dopaminérgica da VTA quando o animal é exposto a um estímulo apetitivo, enquanto que sinais anorexígenos têm papel contrário, inibindo o disparo de neurônios da VTA e diminuindo a atividade dopaminérgica (Leininger et al., 2011).

Na obesidade, parece haver um ciclo vicioso em que a ingestão excessiva de comida prejudica a sensibilidade do sistema de recompensa, que por sua vez leva a

um consumo excessivo para tentar compensar a baixa atividade do sistema. A pergunta que fica é: o que surge primeiro no indivíduo obeso, o consumo excessivo ou a desregulação do sistema de recompensa?

Existe um grande debate na comunidade científica a respeito da adicção aos alimentos. O termo adicção dá a ideia de falta de controle sobre o comportamento do indivíduo, ou até uma desculpa para tal comportamento. Alguns autores propõem que a obesidade, ou melhor, que o consumo excessivo de alimentos, assim como as drogas de abuso, seria um transtorno de motivação apetitiva (Stice, Figlewicz, Gosnell, Levine, & Pratt, 2013). Apesar de não haver um consenso sobre o papel adictivo dos alimentos, é inegável a similaridade tanto de vias encefálicas como de neurotransmissores envolvidos com o abuso de drogas e o consumo excessivo de alimentos.

## **Objetivo**

Visto que existe uma forte relação entre a manipulação neonatal, estresse, comportamento alimentar e sistema de recompensa, o objetivo deste trabalho foi estudar as interações entre manipulação neonatal e acesso crônico a uma dieta palatável sobre a resposta a eventos estressores e sobre circuitos encefálicos de recompensa.

## **Objetivos específicos**

- 1.** Verificar os efeitos da manipulação neonatal sobre o ganho de peso corporal e consumo de alimento palatável durante o desenvolvimento (a partir do desmame) em ratos adultos (60 dias);
- 2.** Verificar os efeitos da manipulação neonatal e da exposição crônica à dieta palatável sobre parâmetros metabólicos bioquímicos (níveis plasmáticos de glicose, leptina e perfil lipídico) em ratos adultos;
- 3.** Verificar os efeitos da manipulação neonatal e da exposição crônica à dieta palatável sobre o comportamento alimentar dos animais adultos quando expostos a novos alimentos palatáveis;
- 4.** Verificar possível interação entre manipulação neonatal e dieta palatável via eixo HHA, através da dosagem plasmática de corticosterona antes e após evento estressor agudo (imobilização por 30 minutos) na idade adulta;
- 5.** Verificar os efeitos da manipulação neonatal e da exposição crônica à dieta palatável sobre as concentrações de receptores dopaminérgicos D2 e da enzima tirosina hidroxilase no núcleo accumbens de animais adultos.

## II. Artigo

Artigo a ser submetido na revista *Appetite*.

### **Chronic access to a highly palatable diet during development increases stress response and alters food preference in male adult rats**

Marina de Lima Marcolin <sup>a</sup>, André de Noronha Dantas Benitz <sup>a</sup>, Rachel Krolow <sup>b</sup>, Carla Dalmaz <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação Neurociências, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Mailing address: Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo), Laboratório 37

CEP: 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: 55 51- 3308-5570

Fax: 55 51- 3308-5535

E-mail: [marina.marcolin@gmail.com](mailto:marina.marcolin@gmail.com)

#### **Abstract**

Early life interventions, such as brief separation of pups from their mothers, may permanently affect several brain systems that are not yet mature, such as the stress response system. An animal model quite used to investigate these interventions is neonatal handling. Pups handled in the first two weeks of life have, as adults, less fear and increased locomotion when exposed to a new environment, and also an increased intake of palatable food when compared to non-handled animals. The consumption of high palatable foods may have “comforting” properties and may be consumed when the animal is exposed to aversive or stressful situations. Also, the increased consumption of

high palatable diet is associated with obesity, and overconsumption of sweet foods may be related to an altered brain reward circuits. The aim of this study was to evaluate the effect of neonatal handling on chronic palatable food consumption, and the interaction between these two interventions on stress response and reward system. Wistar rats were handled (10 min/day), or not (control groups), on days 1–10 after birth. Males from these groups were divided into 2 subgroups, which received standard lab chow or standard lab chow + a highly palatable diet (enriched with simple carbohydrates, made from condensed milk) from postnatal day 21 to 61. Rats receiving the highly palatable diet consumed more food, more calories, gained more weight, but had a lower caloric efficiency than the standard chow groups. The chronic access to a highly palatable diet led to a higher response to an acute stressor and a higher abdominal fat, plasma leptin and triglycerides, and also lower preference for novel palatable food. The neonatal handling had no significant effect on most analyzed parameters.

## **1. Introduction**

It is remarkable the high number of obese individuals especially among children and adolescents. The enormous offer and consumption of highly caloric and palatable foods added to a sedentary life style, present since pre-scholar age, are important risk factors to development of obesity, predisposition to type 2 diabetes and cardiovascular problems in adulthood (Lindberg et al., 2011). One of the many research lines to understand the beginning and maintenance of obesity focus on the feeding behavior, which comprehends psychological (or hedonic) and homeostatic (or metabolic, such as caloric demand, nutrient absorption) aspects (Ely et al., 1997; Harrold, Dovey, Blundell, & Halford, 2012).

Palatable foods, also known as “comfort foods”, are a natural reward and have powerful motivational properties, which are used in several behavioral tasks in animal models of feeding behavior investigation. The ingestion of sucrose solutions promotes an increased dopamine release in nucleus accumbens, prefrontal cortex and hypothalamus, brain regions related with feeding behavior (Adam & Epel, 2007; Hajnal et al., 2004; Papaioannou, Dafni, Alikaridis, Bolaris, & Stylianopoulou, 2002). Data from literature suggest that is necessary an integrity of dopamine, serotonin and opioid

pathways for having a normal or adequate eating response to food tasting stimuli (Blundell, 1991).

Feeding behavior can also be affected by several environmental aspects, such as stressful situations. There are important relationships between corticosterone plasma levels (one of the main rodent late response to stress hormone) and the amount of sweetened solution ingested, showing that glucocorticoids alters preference and consumption of foods (Dallman et al., 2003). It has been suggested that palatable foods may have “comforting” properties and may be consumed when the animal is exposed to aversive or stressful situations (Adam & Epel, 2007). Evidences also point that overconsumption of sweet foods may be related to brain reward circuits which include nucleus accumbens as one important participant, leading to an binge or compulsive eating which may result in overweight and obesity (Adam & Epel, 2007; Figlewicz et al., 2011).

Another aspect quite present in many children life nowadays is the regular parents’ absence, especially from the mother that is back to work during children development, and whose behavior may be modified trying to compensate the time away from the children. In this context, early life interventions, such as brief separation of pups from their mothers, may alter in a permanent way several brain systems that are not yet mature, including the structures involved in the stress response (Meaney & Aitken, 1985). An animal model quite used to investigate early life interventions effects is the neonatal handling. Studies point that animals handled during the firsts two weeks of life have in adulthood less fear of novel environments, increased exploratory activity and greater consumption of palatable foods than non-handled animals (Levine et al., 1967; Silveira et al., 2004).

The neonatal handling increases glucocorticoid receptor expression on hippocampus and frontal cortex, structures involved on hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis regulation (Meaney et al., 1994), leading to a differential sensitivity of the central nervous system to the negative feedback mechanism of the adrenal gland (Levine, 1957, 1994). Data from our laboratory suggest that both the motivation to approach food or the hedonic impact of reward represented by tasty food can be affected by neonatal environment (Silveira et al., 2005, 2006). These animals increase



consumption of palatable food when they are presented with this type of food in the adult life during brief periods, and this appears to be due to the "comforting" effect (Benetti et al., 2007), suggesting an interaction between the reward circuitry and HPA axis. The aim of this study was to evaluate the effect of neonatal handling on chronic palatable food consumption, and the interaction between these two interventions on stress response and reward system.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Experimental design**

All animal proceedings were approved by the Institutional Ethical Committee (CEUA-UFRGS, #23340) and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology (FeSBE) and Brazilian Law on the use of animals (Federal Law Arouca 11.794/2008). All efforts were done to minimize animal suffering as well as to reduce the number of animals.

Thirty three pregnant Wistar females on gestational day 18, bred in our own animal facility, were housed alone in home cages made of Plexiglas (65×25×15 cm) with the floor covered with sawdust. All animals were maintained in a controlled environment: lights on between 07:00 h and 19:00 h, temperature of 22±2 °C, cage cleaning twice a week, food and water provided *ad libitum*. The day of birth was considered day 0 and the litters were culled in 8 pups within 24 h.

The litters were randomly divided into two groups: (1) handled (H) and (2) non-handled (NH). The neonatal handling occurred between days 1–10 after birth, between 11:00 h and 14:00 h, for 10 min/day (Silveira et al., 2004). Once during this period, dirty sawdust was carefully removed from one side of the cage, without disturbing the mother and the nest, and replaced by clean sawdust at that side by the main researcher.

Litters were weaned on postnatal day (PND) 21. Only the male offspring were used in this study. Male pups were weighed and randomly distributed into two more groups, in such a way that no more than two animals per litter were used in the same group: receiving (1) only standard lab show (C) or (2) the lab chow plus a highly

palatable diet (D) (made with condensed milk and rich in simple carbohydrates) until adulthood (Arcego et al., 2014). Animals were weighed every 10 days.

After PND 61, animals were used to evaluate feeding consumption in a different environment, using distinct palatable pellets (Froot Loops<sup>®</sup> for experiment 1 and chocolate for experiment 2).

Two weeks after the behavioral evaluations, the animals were subjected to 8h of fasting, weighed again and killed by decapitation. Trunk blood was collected, the brain was removed, and the nucleus accumbens was dissected and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Adrenal glands and two main portions of abdominal adipose tissue (retroperitoneal and gonadal) were also dissected and weighed and the value was divided by animal body weight. A different set of animals was used in the determination of a corticosterone curve after an acute stress (30 minutes of restraint – experiment 3). The experimental design can be seen in Figure 1.

## **2.2. Neonatal handling**

Each day, from PND 1 until PND 10, cages with the mothers and their litters from the handled group were transferred to another room, where the pups were gently removed from the nest and placed in an incubator at  $32^{\circ}\text{C}$ . The cages with the mothers remained in the same room and, after 10 min, pups were returned to their home cages. The researcher changed gloves for the manipulation of each litter to avoid the spread of any kind of odor from nest to nest. Pups of non-handled groups were kept with their mothers without interventions until weaning.

## **2.3. High palatable diet**

The highly palatable diet used in this study was enriched with simple carbohydrates, and made from condensed milk, sucrose, vitamins and salts, powdered standard lab chow, purified soy protein, soy oil, water, methionine and lysine. The nutritional content of this diet is similar to that of a standard lab chow, however most carbohydrates in the palatable diet were sucrose and lactose (from condensed milk). In contrast, the standard lab chow was composed of carbohydrates that were obtained

mainly from starch. The palatable diet was made at least twice a week and the pellets were daily switched and weighed to measure food consumption.

**Table 1.** The nutritional composition/100 g of the different diets

Diet	Energy (kcal)	Carbohydrate (g)	Protein (g)	Lipid (g)
Standard lab chow <sup>a</sup>	301.2	44.3	22.0	4.0
High palatable diet <sup>b</sup>	371.1	43.4	27.0	9.9

a. Nuvilab<sup>®</sup>

b. (Souza et al., 2007)

**Table 2.** Composition of vitamin and mineral salt mixture of mg/100 g of the different diets.

Diet	Vitamin mixture	Mineral salt mixture
Standard lab chow	Vitamin A, 13,000 <sup>a</sup> ; vitamin D3, 2000 <sup>a</sup> ; vitamin E, 34 <sup>a</sup> ; vitamin K3, 0.3; vitamin B1, 0.5; vitamin B2, 0.6; vitamin B6, 0.7; vitamin B12, 2.2; niacin, 6; pantothenic acid, 2; folic acid, 0.1; biotin, 0.005; choline, 190	Sodium, 270; iron, 5; manganese, 6; zinc, 6; copper, 1; iodine, 0.2; selenium, 0.005; cobalt, 0.15; fluorine, 8.
High palatable diet	Vitamin A , 4; vitamin D, 0.5; vitamin E, 10; menadione, 0.5; choline, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacine, 4; pantothenic acid, 4; riboflavin, 0.8; thiamin 0.5; pyridoxine, 0.5; folic acid, 0.2; biotin, 0.04; vitamin B12, 0.003	NaCl, 557; KI,3.2; KH2PO4,1556; MgSO4,229; CaCO3,1526; FeSO4.7H2O, 108; MnSO4.H2O, 16; ZnSO4.7H2O, 2.2; CuSO4.5H2O, 1.9; CoCl.6H2O, 0.09.

a. UI/Kg

#### 2.4. Food consumption and caloric efficiency

Previously weighed amounts of standard lab chow and highly palatable diet were offered and the remaining amounts of pellets were measured daily to evaluate food consumption. The food consumption was measured per cage and this amount of food was divided by the number of animals per cage to determine mean consumption per animal. In these evaluations, n represent the number of cages.

We calculated the caloric efficiency, dividing the animal weight gain in milligrams by the total amount of kilocalories consumed in the period. To verify the amount of kilocalories consumed per animal, we multiplied the amount of food ingested by the caloric content per gram of chow or diet. The standard lab chow has a caloric content of 3.012 kcal/g, whereas the highly palatable diet has a caloric content of 3.711 kcal/g (being 23% more caloric than the standard chow).

## 2.5. Experiments 1 and 2 – Feeding behavior task

A total of 134 animals were used in these experiments (71 on experiment 1 and 63 on experiment 2, n=13-20 animals/group). The feeding behavior task consists of five sessions of habituation to a novel food under food restriction (80% of the usual kcal consumption), and a test session, when animals receive *ad libitum* food in their cages. Animals were placed in one extremity of a rectangular wooden box (40x15x20 cm, with a glass ceiling) and, in the other extremity of the box, the novel food was placed (10 pellets of Froot Loops<sup>®</sup> or 2 pellets of chocolate, previously weighted). During 3 minutes, animals were evaluate regarding the latency to reach the food, the latency to begin eating and the amount of food ingested. Animals that did not eat any pellet of palatable food during the habituation sessions were not tested.

**Table 3.** The nutritional composition/100 g of the different palatable pellets

Palatable pellet	Energy (kcal)	Carbohydrate (g)	Sugar (g)	Lipid (g)
Froot Loops <sup>®</sup>	380	83.3	40	2.6
Garoto <sup>®</sup> milk chocolate	540	56	±50	31.6

## 2.6. Experiment 3 – Corticosterone curve

Two weeks after the feeding behavior test, a set of animals was used to measure the plasma corticosterone variation to an acute stress by 30 minutes of immobilization. A total of twenty animals used in experiment 2 was separated for experiment 3 (n=5-6 animals/group). Animals were individually transported to the test room, and a baseline blood sample (>300µl) from the tail was taken from a small vertical incision along the side of the tail (Vahl et al., 2005) by a syringe previously washed with heparin. Immediately after the first sample withdraw, rats were restrained in well-ventilated a

plastic tube for 30 minutes, to induce an acute stress. Tail blood was collected as previously in three additional times: 30 minutes (at the end of restraint), 60 minutes and 120 minutes, when the animals were free in their cages. The tail was cleaned before every collect with a cloth soaked in hot water to stimulate vasodilatation. Tail blood was centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 10 minutes; the plasma was separated and frozen at -70°C until the analysis. Plasma corticosterone was extracted 3 times with ethyl acetate, the extract was evaporated (Diehl et al., 2007), and corticosterone concentration was measured by enzyme immunoassay (EIA) using a commercial kit from Cayman Chemical Company (cat# 500655, MI, USA), and expressed as ng/ml.

## **2.7. Biochemical analysis**

For determination of plasma levels of glucose, leptin, HDL-cholesterol, triglycerides and total cholesterol, the trunk blood was collected into tubes with EDTA and centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 10 minutes. The plasma was separated and frozen at -70°C until the analysis.

Plasma glucose was measured using a commercial kit from Wiener Laboratories (Rosario, Argentina) (Arcego et al., 2014). HDL-cholesterol was measured using a commercial kit from Labtest Diagnóstica S.A. (Minas Gerais, Brazil) (Krolow et al., 2013). Total cholesterol and triglycerides were measured using a commercial kit from MBiolog Diagnósticos Ltda (Minas Gerais, Brazil). LDL-cholesterol was evaluated through the Friedewald formula (Friedewald, Levy, & Fredrickson, 1972). Plasma leptin was measured by ELISA using a commercial kit from Invitrogen (cat# KRC2281, California, USA).

## **2.8. Western Blot**

For determination of dopamine type 2 receptor (D2R) and tyrosine hydroxylase (TH) immunocontent, nucleus accumbens was homogenized 1:10 (w:v) in extraction buffer (10mM HEPES, 10mM KCl, 0.6mM EDTA, pH 7.9) in the presence of 1% of protein inhibitors cocktail (Sigma) and 0.4% of sodium dodecyl-sulfate (SDS). The homogenate was centrifuged at 1000 x g for 10 minutes at 4°C, the supernatant was removed and centrifuged again at 20300 x g for 30 minutes at 4°C. Aliquots of the

supernatant were used to determine total protein content by modified Lowry reagent (with SDS 10%). Laemi buffer (with SDS) was added to a final concentration of 25%, b-mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%, and 20 µl of samples with 45 µg of protein were run on 8% polyacrylamide gels at 100V, 400 mA for 2 hours and blotted to a nitrocellulose membrane for 1.5 hours at 50V, 400 mA. Membranes were fixed with methanol and acetic acid for 10 minutes, blocked for 2 hours with 5% powdered milk in Tris-buffered saline plus 0.1% Tween-20 (TBS-T), followed by incubation overnight with primary antibody dilutions with TBS-T (1:1000/2000 D2 rabbit IgG, Calbiochem, and 1:2000 TH rabbit IgG, Millipore) on an orbital shaker at 4°C. Following washes in TBS-T, secondary antibody dilutions with the same buffer (1:2000 goat anti-rabbit, Millipore) were prepared and incubated for 2 hours on an orbital shaker at room temperature. All blots were re-probed with  $\beta$ -actin antibody (1:1000 dilution, chicken monoclonal, Sigma) as an internal control. Membranes were washed and immunoreactive bands were revealed by an enhanced chemiluminescence kit (ECL Amersham from GE Healthcare), and detected using Kodak Bio-Max MR film. The immunoblot films were scanned and the digitalized images were analyzed with ImageJ software for quantification.

## **2.9. Statistical analysis**

Statistical analyses were performed by SPSS.19 software and data are expressed as mean $\pm$ standard error of mean, significance was given by  $p < 0.05$ . For analysis of food consumption, animal weight gain, experiment 3 and habituation sessions on experiments 1 and 2, a repeated measures ANOVA was performed (within subjects factor was time; between subjects factors were handling and diet), with Greenhouse-Geisser correction applied considering violation of the Mauchly's test of Sphericity. For the remaining analysis, a two-way ANOVA was performed, with handling and diet as factors.

## **3. Results**

### **3.1. Body weight gain, adipose tissue and adrenal glands**

The body weight of all animals increased with time [repeated measures ANOVA:  $F(1.58,204.84) = 9426.14$ ,  $p < 0.001$ , correction for Greenhouse-Geisser]. A two-way ANOVA showed that groups receiving the highly palatable diet gained more weight than the groups receiving the standard lab chow [ $F(1,134) = 44.76$ ,  $p < 0.001$ ], and groups that were neonatal handled gained more weight than control groups [ $F(1,134) = 6.76$ ,  $p < 0.01$ ], with no interaction between handling and diet (Fig. 2A and 2B).

In accordance with body weight, animals receiving high palatable diet had more abdominal adipose tissue than animals receiving standard lab chow [ $F(1,53) = 13.78$ ,  $p < 0.001$ ] (Fig. 2C). Also, animals that were neonatal handled had smaller adrenal glands than control animals [ $F(1,53) = 6.255$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig. 2D).

### **3.2. Food consumption and caloric efficiency**

Food consumption of all animals increased with time [repeated measures ANOVA:  $F(12.28,589.68) = 351.75$ ,  $p < 0.001$ , correction for Greenhouse-Geisser], and groups receiving the highly palatable diet had a higher consumption than the groups receiving the standard lab chow [within subjects:  $F(12.28,589.68) = 15.78$ ,  $p < 0.001$ , and between subjects:  $F(1,48) = 302.66$ ,  $p < 0.001$ ] (Fig. 3A). A two-way ANOVA showed that animals from high palatable group ate more kcal at the end of 35 days of experiment than groups receiving standard lab chow [ $F(1,52) = 218$ ,  $p < 0.001$ ] and had a lower caloric efficiency [ $F(1,134) = 581.76$ ,  $p < 0.001$ ] (Fig. 3B and 3C).

### **3.3. Experiments 1 and 2 – Feeding behavior task**

#### **3.3.1. Consumption of Froot Loops<sup>®</sup>**

During habituation, repeated measures ANOVA showed that latency to begin eating the food and amount of food eaten varied over time in all groups [ $F(3.21,214.97) = 119.37$ ,  $p < 0.001$  and  $F(3.5,234.64) = 124.76$ ,  $p < 0.001$  respectively, correction for Greenhouse-Geisser] and animals receiving the high palatable diet had higher latency to eat [between subjects:  $F(1,67) = 4.69$ ,  $p < 0.05$ ] and ate less pellets than animals receiving standard lab chow [between subjects:  $F(1,67) = 6.71$ ,  $p < 0.05$ , and within

subjects:  $F(3.5,234.64) = 3.55$ ,  $p < 0.05$ , correction for Greenhouse-Geisser]. There was no difference between groups in the latency to reach the food.

During the test, a two-way ANOVA showed that animals that were neonatal handled had lower latency to reach the food than control animals [ $F(1,69) = 5.54$ ,  $p < 0.05$ ]. Animals receiving the highly palatable diet had higher latency to reach the food and ate fewer pellets of food than animals receiving standard lab chow [ $F(1,69) = 4.68$ ,  $p < 0.05$  and  $F(1,69) = 5.98$ ,  $p < 0.05$ , respectively]. There was no difference between groups in the latency to begin eating the food (Fig. 4A, 4B and 4C). Also, the amount of energy (kcal) consumed during the night before the test session was higher on groups receiving the highly palatable diet [ $F(1,71) = 83.02$ ,  $p < 0.001$ ], but there was no handling effect or interaction between handling and diet (Fig. 4D).

### **3.3.2. Consumption of chocolate**

During habituation, repeated measures ANOVA showed that latency to reach the food, latency to eat the food and amount of food eaten vary over time in all groups [ $F(1.68,99.25) = 5.96$ ,  $p < 0.001$ ;  $F(2.03,119.98) = 212.59$ ,  $p < 0.001$  and  $F(2.73,161.17) = 250.01$ ,  $p < 0.001$  respectively, correction for Greenhouse-Geisser], but there was no effect or interaction between handling and diet.

During the test, a two-way ANOVA showed that there was no difference between groups in all three parameters analyzed (Fig. 5A, 5B and 5C). However, the amount of energy (kcal) consumed during the night before the test session was higher in groups receiving the highly palatable diet and in groups that were handled during the neonatal period [ $F(1,63) = 82.61$ ,  $p < 0.001$  and  $F(1,63) = 4.09$ ,  $p < 0.05$ , respectively], but there was no interaction between handling and diet (Fig. 5D).

### **3.4. Experiment 3 – Corticosterone curve**

When plasma corticosterone was measured at different times after exposure to a stressor (restraint), a repeated measures ANOVA showed that corticosterone concentration varied over time in all groups [ $F(1.78,30.31) = 12.49$ ,  $p < 0.001$ , correction for Greenhouse-Geisser], and animals receiving the high palatable diet had a higher corticosterone secretion than animals receiving standard lab chow [between subjects:



F(1,17) = 6.66, p<0.05], with no handling effect or interaction between handling and diet (Fig. 6). A two-way ANOVA showed no difference in basal corticosterone level between groups [F(1,17) = 3.25, p=0,089].

### 3.5. Biochemical analysis

A two-way ANOVA showed that animals receiving the highly palatable diet had higher plasma levels of triglycerides and leptin than animals receiving standard lab chow [F(1,28) = 6.63 p<0.05 and F(1,28) = 19.56, p<0.001, respectively], with no handling effect or interaction between handling and diet. There was no difference between groups on plasma glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol or LDL-cholesterol levels (Table 4).

**Table 4.** Effects of neonatal handling and access to high palatable diet on plasma levels of glucose, leptin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides.

	Groups			
	NH-C	H-C	NH-D	H-D
<b>Glucose</b>	114.23 ± 7.17	116.92 ± 3.65	114.83 ± 5.04	124.06 ± 4.77
<b>Leptin</b>	1807.37 ± 217.82	1578.16 ± 173.76	2773.02 ± 373.93 <sup>#</sup>	2906.73 ± 227.12 <sup>#</sup>
<b>Total cholesterol</b>	67.84 ± 13.03	86.82 ± 19.86	55.74 ± 2.64	60.62 ± 1.55
<b>HDL-cholesterol</b>	14.10 ± 0.88	13.11 ± 0.77	13.82 ± 0.42	14.39 ± 0.57
<b>LDL-cholesterol</b>	30.19 ± 13.74	48.04 ± 20.47	14.94 ± 2.68	17.88 ± 2.04
<b>Triglycerides</b>	117.72 ± 4.29	128.39 ± 9.04	134.86 ± 4.89 <sup>†</sup>	141.73 ± 4.01 <sup>†</sup>

Data are expressed as mean ± SEM (N = 7/group) of plasma glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides (mg/dl) and leptin (pg/ml).

# Highly palatable diet increased leptin levels (two-way ANOVA, p<0.05)

† Highly palatable diet increased triglycerides levels (two-way ANOVA, p<0.05)

### 3.6. Western blot

A two-way ANOVA showed no difference between groups on dopamine type 2 receptor (Fig. 7A) and tyrosine hydroxylase (Fig. 7B) immunocontent on nucleus accumbens.

#### 4. Discussion

As expected, animals increased food consumption and gained weight during the 35 days of analysis, and these parameters were accentuated when animals received the high palatable diet. However, caloric efficiency in groups receiving this diet was lower than standard chow groups, and although animals were eating more calories, they did not gain as much weight as could be expected. Neonatal handled animals gained more weight and had smaller adrenal glands than control groups, which is in accordance with data from the literature (Sapolsky & Meaney, 1986). In our previous study with young rats (Marcolin et al., 2012), we did not observe the neonatal handling effect on adrenal glands weight when measured in the prepubertal period, suggesting that this effect can only be detected on adrenal glands in adulthood.

In accordance with their body weights, animals receiving high palatable diet had more abdominal adipose tissue than animals receiving standard lab chow, which could explain the higher level of plasma leptin (Arcego et al., 2014; Shalev et al., 2010). Leptin is an important anorexigenic factor whose plasma concentrations are positively correlated with fat mass and it acts inhibiting food intake via hypothalamic leptin receptors. However, in some obese subjects, despite the high levels of leptin, there is an impairment in its action due to a leptin resistance (D'souza, Asadi, Johnson, Covey, & Kieffer, 2014). Also, high plasma levels of triglycerides are associated with leptin resistance (Banks et al., 2004; Vasselli, Scarpace, Harris, & Banks, 2013). Since animals receiving high palatable diet had higher levels of plasma leptin and, despite this increase, also showed higher food intake, we could suggest a possible leptin resistance in these animals. Despite the apparently distinct plasma glucose level of H-D animals, there was no statistical difference between groups on a two-way ANOVA. Unlike our previous study with young rats, plasma glucose in adults was not affected by the highly palatable diet, suggesting an adaptation process in relation to this parameter.

Animals chronically fed with high palatable diet had an increased corticosterone secretion after acute stress, especially those from the non-handled group. Also, neonatal handled animals fed with high palatable diet have greater delay in returning corticosterone to normal levels, as shown by higher levels at 60 minutes, suggesting an impairment in the negative feedback. It is possible that a highly palatable diet

chronically offered does not act like a reducing stress agent, but on the contrary, as an inducing stress agent (South, Westbrook, & Morris, 2012; Tannenbaum et al., 1997). Other studies have found an increase in corticosterone levels in chronic (Pratchayasakul et al., 2011) and non-chronic highly palatable diet fed animals (Park, Kim, Lee, & Jahng, 2014), but although some of them have found alterations on basal levels of corticosterone, we did not. Nevertheless, this result strongly suggests that a highly palatable diet is able to increase HPA axis reactivity. Neonatal handling had no effect on corticosterone curve in response to acute stressor, which is not in accordance with classical studies showing that neonatal handling diminishes corticosterone levels after acute stress (Meaney et al., 1994; Meaney, Aitken, Berkel, Bhatnagar, & Sapolsky, 1988; Meaney, Aitken, Sharma, & Viau, 1992; Meaney, Mitchell, et al., 1991; Meaney, Viau, et al., 1991; Plotsky & Meaney, 1993). This difference may be attributed to protocol differences on neonatal handling procedure and to the animal's ages when tested. Most of experiments conducted by Meaney and colleagues used higher time of handling (15 to 20 minutes, while ours is 10 minutes) which were performed usually until weaning, whereas we only handled the animals during the first 10 days of life. Additionally, the neonatal handling effect on corticosterone curve was previously tested in older animals (6 months age) than the ones used on this study (3 months age), and it only appeared in much older animals, with 22 and 24 months (Meaney et al., 1988). In addition, we did not found any difference in basal corticosterone levels between H and NH animals, which is in accordance with literature data.

On the feeding behavior task, neonatal handled animals had lower latency to reach the food, but no difference on the amount of food eaten during habituation or during test, only on kcal consumed on the night before the test session with chocolate, while some reports have observed that both these parameters may increase (Benetti et al., 2007; Portella et al., 2010; Silveira et al., 2004, 2008, 2010; Silveira, Benetti, et al., 2006; Silveira, Cognato, et al., 2006). Some methodological differences between these studies may be pointed, such as the fact that, in those reports, animals were exposed to a novel palatable food only in adulthood, whereas in this study there was access since weaning, plus a second exposure in adulthood. The previous exposure to a high palatable diet could alter animal's preference towards novel sweet food (Silveira et al.,

2008). Furthermore, previous chronic access to high sugar diet made animals eat more pellets, which could be due to a down-regulation of the reward system (Johnson & Kenny, 2010), which do not respond normally when other sweet food was available. In this regard, we did not find any differences in D2 receptor on nucleus accumbens. Also, animals fed with a highly palatable diet had a high consumption of this palatable food on the night before the test, which could explain their decreased preference for the pellets during the test when they were fed (Stice, Yokum, Blum, & Bohon, 2010). Added to the fact of the characteristics of the highly palatable diet to which they were used for a long time being quite different from palatable foods tested in adulthood, regarding texture and nutritional content (combination of sugar and fat), these results appear to indicate that these animals have a lower preference for novel food both during fast and fed state.

In conclusion, the access to a highly palatable diet during animal development (since weaning until the adulthood) led to a higher response to an acute stressor, higher abdominal fat, plasma leptin and body weight, and also a lower preference for novel palatable food. The chronic consumption of food enriched with simple carbohydrates did not appear to be able to change the reward system of these animals, and the neonatal handling had no significant effect on most analyzed parameters. Further investigation is needed to understand how interventions and the type of diet eaten during development affect brain and behavior, which may help to elucidate the mechanisms underlying the alterations in brain and behavior related to eating disorders.

## 5. References

- Adam, T. C., & Epel, E. S. (2007). Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavior*, *91*, 449 – 458. doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.011
- Arcego, D. M., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Ferreira, A. G. K., Scherer, E., ... 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 & Behavior*, *124*, 23–32. doi:10.1016/j.physbeh.2013.10.029
- Banks, W. A., Coon, A. B., Robinson, S. M., Moinuddin, A., Shultz, J. M., Nakaoke, R., & Morley, J. E. (2004). Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain

barrier. *Diabetes*, 53(5), 1253–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111494>

Benetti, C. da S., Silveira, P. P., Portella, A. K., Diehl, L. A., Nunes, E., de Oliveira, V. S., ... Goldani, M. Z. (2007). Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatric Research*, 62(4), 405–11. doi:10.1203/PDR.0b013e31813cbe8b

Blundell, J. E. (1991). Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(4), 147–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2063481>

D'souza, A. M., Asadi, A., Johnson, J. D., Covey, S. D., & Kieffer, T. J. (2014). Leptin deficiency in rats results in hyperinsulinemia and impaired glucose homeostasis. *Endocrinology*, 155(4), 1268–79. doi:10.1210/en.2013-1523

Dallman, M. F., Akana, S. F., Laugero, K. D., Gomez, F., Manalo, S. L., Bell, M. E., & Bhatnagar, S. (2003). A spoonful of sugar: feedback signals of energy stores and corticosterone regulate responses to chronic stress. *Physiology & Behavior*, 79(1), 3–12. doi:10.1016/S0031-9384(03)00100-8

Diehl, L. A., Silveira, P. P., Leite, M. C., Crema, L. M., Portella, A. K., Billodre, M. N., ... Dalmaz, C. (2007). Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Research*, 1144, 107–16. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.084

Ely, D. R., Dapper, V., Marasca, J., Corrêa, J. B., Gamaro, G. D., Xavier, M. H., ... Dalmaz, C. (1997). Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology & Behavior*, 61(3), 395–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089758>

Figlewicz, D. P., Bennett-Jay, J. L., Kittleson, S., Sipols, A. J., & Zavosh, A. (2011). Sucrose self-administration and CNS activation in the rat. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(4), R876–84. doi:10.1152/ajpregu.00655.2010

Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499–502. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337382>

Hajnal, A., Smith, G. P., & Norgren, R. (2004). Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(1), R31–7. doi:10.1152/ajpregu.00282.2003

- Harrold, J. A., Dovey, T. M., Blundell, J. E., & Halford, J. C. G. (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, *63*(1), 3–17. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.01.007
- Johnson, P. M., & Kenny, P. J. (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience*, *13*(5), 635–41. doi:10.1038/nn.2519
- Krolow, R., Noschang, C., Arcego, D. M., Huffell, A. P., Marcolin, M. de L., Benitz, A. de N. D., ... Dalmaz, C. (2013). Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism Clinical and Experimental*, *62*(9), 1268–78. doi:10.1016/j.metabol.2013.04.009
- Levine, S. (1957). Infantile Experience and Resistance to Physiological Stress. *Science*, (1), 405–405.
- Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *746*, 275–88; discussion 289–93. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb39245.x
- Levine, S., Haltmeyer, G. C., Karas, G. G., & Denenberg, V. H. (1967). Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behavior*, *2*(1), 55–59. doi:10.1016/0031-9384(67)90011-X
- Lindberg, M. A., Dementieva, Y., & Cavender, J. (2011). Why has the BMI gone up so drastically in the last 35 years? *Journal of Addiction Medicine*, *5*(4), 272–278. doi:10.1097/ADM.0b013e3182118d41
- Marcolin, M. de L., Benitz, A. de N. D., Arcego, D. M., Noschang, C., Krolow, R., & Dalmaz, C. (2012). Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiology & Behavior*, *106*(4), 491–8. doi:10.1016/j.physbeh.2012.03.025
- Meaney, M. J., & Aitken, D. H. (1985). The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Developmental Brain Research*, *354*(2), 301–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4052820>
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Berkel, C. Van, Bhatnagar, S., & Sapolsky, R. M. (1988). Effect of Neonatal Handling on Age-Related Impairments Associated with the Hippocampus. *Science*, *239*(17), 766–768.
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Sharma, S., & Viau, V. (1992). Basal ACTH, Corticosterone and Corticosterone-Binding Globulin Levels over the Diurnal Cycle, and Age-Related Changes in Hippocampal Type I and Type II Corticosteroid

Receptor Binding Capacity in Young and Aged, Handled and Nonhandled Rats. *Neuroendocrinology*, 55(2), 204–213. doi:10.1159/000126116

Meaney, M. J., Mitchell, J. B., Aitken, D. H., Bhatnagar, S., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., & Sarrieau, A. (1991). The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology*, 16(1-3), 85–103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1961847>

Meaney, M. J., Tannenbaum, B. M., Francis, D. D., Bhatnagar, S., Shanks, N., Viau, V., ... Plotsky, P. M. (1994). Early environmental programming hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Seminars in Neuroscience*, 6(4), 247–259. doi:10.1006/smns.1994.1032

Meaney, M. J., Viau, V., Bhatnagar, S., Betito, K., Iny, L. J., O'Donnell, D., & Mitchell, J. B. (1991). Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *The Journal of Steroid, Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2), 265–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1888687>

Papaioannou, A., Dafni, U., Alikaridis, F., Bolaris, S., & Stylianopoulou, F. (2002). Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience*, 114(1), 195–206.

Park, E., Kim, J. Y., Lee, J.-H., & Jahng, J. W. (2014). Increased depression-like behaviors with dysfunctions in the stress axis and the reward center by free access to highly palatable food. *Neuroscience*, 262, 31–9. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.12.054

Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497182>

Portella, A. K., Silveira, P. P., Diehl, L. A., Crema, L. M., Clemente, Z., Peres, W., ... Dalmaz, C. (2010). Early life handling decreases serotonin turnover in the nucleus accumbens and affects feeding behavior of adult rats. *Developmental Psychobiology*, 52(2), 190–6. doi:10.1002/dev.20420

Pratchayasakul, W., Kerdphoo, S., Petsophonsakul, P., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2011). Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. *Life Sciences*, 88(13-14), 619–27. doi:10.1016/j.lfs.2011.02.003

Sapolsky, R. M., & Meaney, M. J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hypo-responsive

period. *Brain Research*, 396(1), 64–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3011218>

- Shalev, U., Tylor, A., Schuster, K., Frate, C., Tobin, S., & Woodside, B. (2010). Long-term physiological and behavioral effects of exposure to a highly palatable diet during the perinatal and post-weaning periods. *Physiology & Behavior*, 101(4), 494–502. doi:10.1016/j.physbeh.2010.07.018
- Silveira, P. P., Benetti, C. da S., Ayres, C., Pederiva, F. Q., Portella, A. K., Lucion, A. B., & Dalmaz, C. (2006). Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behavioural Brain Research*, 173(2), 205–10. doi:10.1016/j.bbr.2006.06.031
- Silveira, P. P., Cognato, G., Crema, L. M., Pederiva, F. Q., Bonan, C. D., Sarkis, J. J., ... Dalmaz, C. (2006). Neonatal handling, sweet food ingestion and ectonucleotidase activities in nucleus accumbens at different ages. *Neurochemical Research*, 31(5), 693–8. doi:10.1007/s11064-006-9069-z
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Assis, S. A. C. N., Nieto, F. B., Diehl, L. A., Crema, L. M., ... Dalmaz, C. (2010). Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(1), 111–8. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.08.018
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Clemente, Z., Bassani, E., Tabajara, Â. S., Gamaro, G. D., ... Dalmaz, C. (2004). Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiology & Behavior*, 80(5), 739–45. doi:10.1016/j.physbeh.2003.12.009
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Clemente, Z., Gamaro, G. D., & Dalmaz, C. (2005). The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(1), 93–9. doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.07.018
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Crema, L. M., Correa, M. D., Nieto, F. B., Diehl, L. A., ... Dalmaz, C. (2008). Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. *Physiology & Behavior*, 93, 877–882. doi:10.1016/j.physbeh.2007.12.003
- South, T., Westbrook, F., & Morris, M. J. (2012). Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. *Physiology & Behavior*, 105(4), 1052–7. doi:10.1016/j.physbeh.2011.11.019
- Souza, C. G., Moreira, J. D., Siqueira, I. R., Pereira, A. G., Rieger, D. K., Souza, D. O., ... Perry, M. L. S. (2007). Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*, 81(3), 198–203. doi:10.1016/j.lfs.2007.05.001



- Stice, E., Yokum, S., Blum, K., & Bohon, C. (2010). Weight gain is associated with reduced striatal response to palatable food. *The Journal of Neuroscience*, *30*(39), 13105–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.2105-10.2010
- Tannenbaum, B. M., Brindley, D. N., Tannenbaum, G. S., Dallman, M. F., McArthur, M. D., & Meaney, M. J. (1997). High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *The American Journal of Physiology*, *273*(6 Pt 1), E1168–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435533>
- Vahl, T. P., Ulrich-Lai, Y. M., Ostrander, M. M., Dolgas, C. M., Elfers, E. E., Seeley, R. J., ... Herman, J. P. (2005). Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, *289*(5), E823–8. doi:10.1152/ajpendo.00122.2005
- Vasselli, J. R., Scarpace, P. J., Harris, R. B. S., & Banks, W. A. (2013). Dietary components in the development of leptin resistance. *Advances in Nutrition*, *4*(2), 164–75. doi:10.3945/an.112.003152

## Legend to figures

**Figure 1.** Experimental design. *PND* postnatal day, *NAC* nucleus accumbens.

**Figure 2.** Effects of neonatal handling and access to a highly palatable diet on (A) body weight evolution over time, (B) body weight gain, (C) amount of abdominal fat and (D) adrenal glands weight. Data expressed as mean $\pm$ SEM,  $N=63-78$  for A and B,  $N=25-28$  for C and D. Repeated measures ANOVA showed that body weight of all animals increased with time ( $p<0.001$ ). A two-way ANOVA showed that highly palatable diet groups gained more weight than standard lab chow groups ( $p<0.001$ ), neonatal handled groups gained more weight than control groups ( $p<0.01$ ), high palatable diet groups had more abdominal adipose tissue than standard lab chow groups ( $p<0.001$ ), and neonatal handled groups had smaller adrenal glands than control groups ( $p<0.05$ ). *NH-C* non-handled chow, *H-C* handled chow, *NH-D* non-handled palatable diet, *H-D* handled palatable diet.

**Figure 3.** Effects of neonatal handling and access to a highly palatable diet on (A) food consumption over time, (B) total food consumption in 35 days and (C) caloric efficiency. Data expressed as mean $\pm$ SEM,  $N=65-69$  for A and B,  $N=65-69$  for C. Repeated measures ANOVA showed that food consumption of all animals increased with time ( $p<0.001$ ). A two-way ANOVA showed that animals from the highly palatable groups had a higher total kcal intake at the end of 35 days of experiment ( $p<0.001$ ) and had a lower caloric efficiency ( $p<0.001$ ) than standard lab chow groups. *NH-C* non-handled chow, *H-C* handled chow, *NH-D* non-handled palatable diet, *H-D* handled palatable diet.

**Figure 4.** Effects of neonatal handling and access to a highly palatable diet on feeding behavior task with Froot Loops<sup>®</sup>: (A) latency to reach the food, (B) latency to begin eating the food, (C) amount of food ingested and (D) food consumption during the night before the test session. Data expressed as mean $\pm$ SEM,  $N=34-37$  for habituation session and D,  $N=32-37$  for test session. A repeated measures ANOVA showed that, during habituation, latency to begin eating the food and amount of food eaten varied

over time in all groups ( $p < 0.001$  for both) and the highly palatable diet groups had higher latency to eat ( $p < 0.05$ ) and ate less pellets than standard lab chow groups ( $p < 0.05$ ). A two-way ANOVA showed that, during test, neonatal handled groups had lower latency to reach the food than control groups ( $p < 0.05$ ), and the highly palatable diet groups had higher latency to reach the food ( $p < 0.05$ ), ate fewer pellets of food than animals receiving standard lab chow ( $p < 0.05$ ) and consumed more kcal during the night before the test session than standard lab chow groups ( $p < 0.001$ ). *NH-C* non-handled chow, *H-C* handled chow, *NH-D* non-handled palatable diet, *H-D* handled palatable diet.

**Figure 5.** Effects of neonatal handling and access to a highly palatable diet on feeding behavior task with chocolate: (A) latency to reach the food, (B) latency to begin eating the food, (C) amount of food ingested and (D) food consumption during the night before the test session. Data expressed as mean $\pm$ SEM,  $N=29-34$  for habituation session and  $N=28-34$  for test session. A repeated measures ANOVA showed that, during habituation, latency to reach the food, latency to eat the food and amount of food eaten vary over time in all groups ( $p < 0.001$  for all). A two-way ANOVA showed that, during test session, there was no difference between groups in all three parameters analyzed ( $p < 0.05$ ), and the highly palatable diet groups and neonatal handled groups consumed more kcal during the night before the test session than control groups ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively). *NH-C* non-handled chow, *H-C* handled chow, *NH-D* non-handled palatable diet, *H-D* handled palatable diet.

**Figure 6.** Effects of neonatal handling and access to a highly palatable diet on corticosterone levels. Data expressed as mean $\pm$ SEM,  $N=10-11$ . Repeated measures ANOVA showed that corticosterone concentration varied over time in all groups ( $p < 0.001$ ) and the highly palatable diet groups had a higher corticosterone secretion than standard lab chow groups ( $p < 0.05$ ). Two-way ANOVA showed no difference in basal corticosterone concentration ( $p > 0.05$ ). *NH-C* non-handled chow, *H-C* handled chow, *NH-D* non-handled palatable diet, *H-D* handled palatable diet.

**Figure 7.** Effects of neonatal handling and access to a highly palatable diet on (A) D2 receptor and (B) tyrosine hydroxylase immunoccontent on nucleus accumbens. Data expressed as mean $\pm$ SEM as percentage of control normalized by  $\beta$ -actin,  $N = 4-6$ . Two-way ANOVA showed no difference between groups ( $p > 0.05$ ). *NH-C* non-handled chow, *H-C* handled chow, *NH-D* non-handled palatable diet, *H-D* handled palatable diet.

Figure 1.

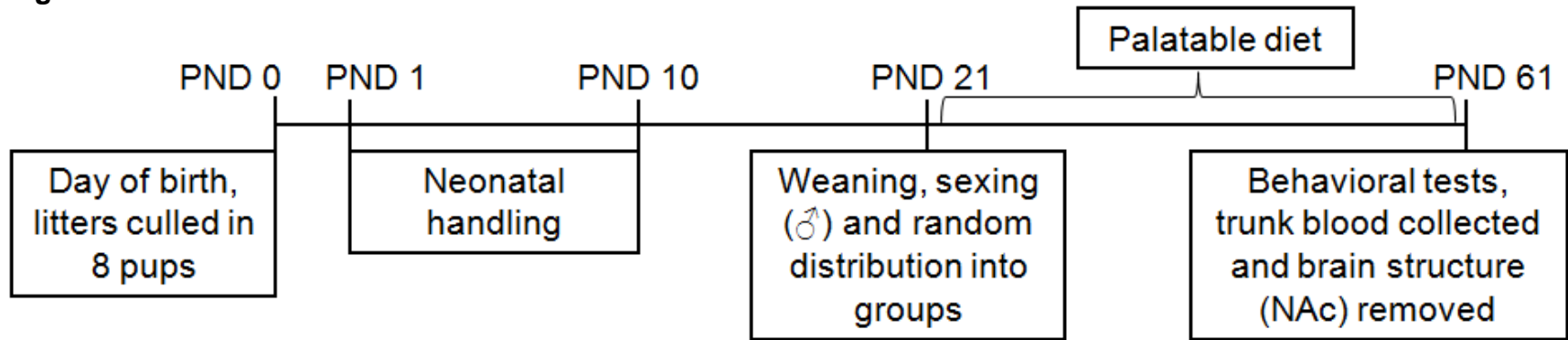


Figure 2.

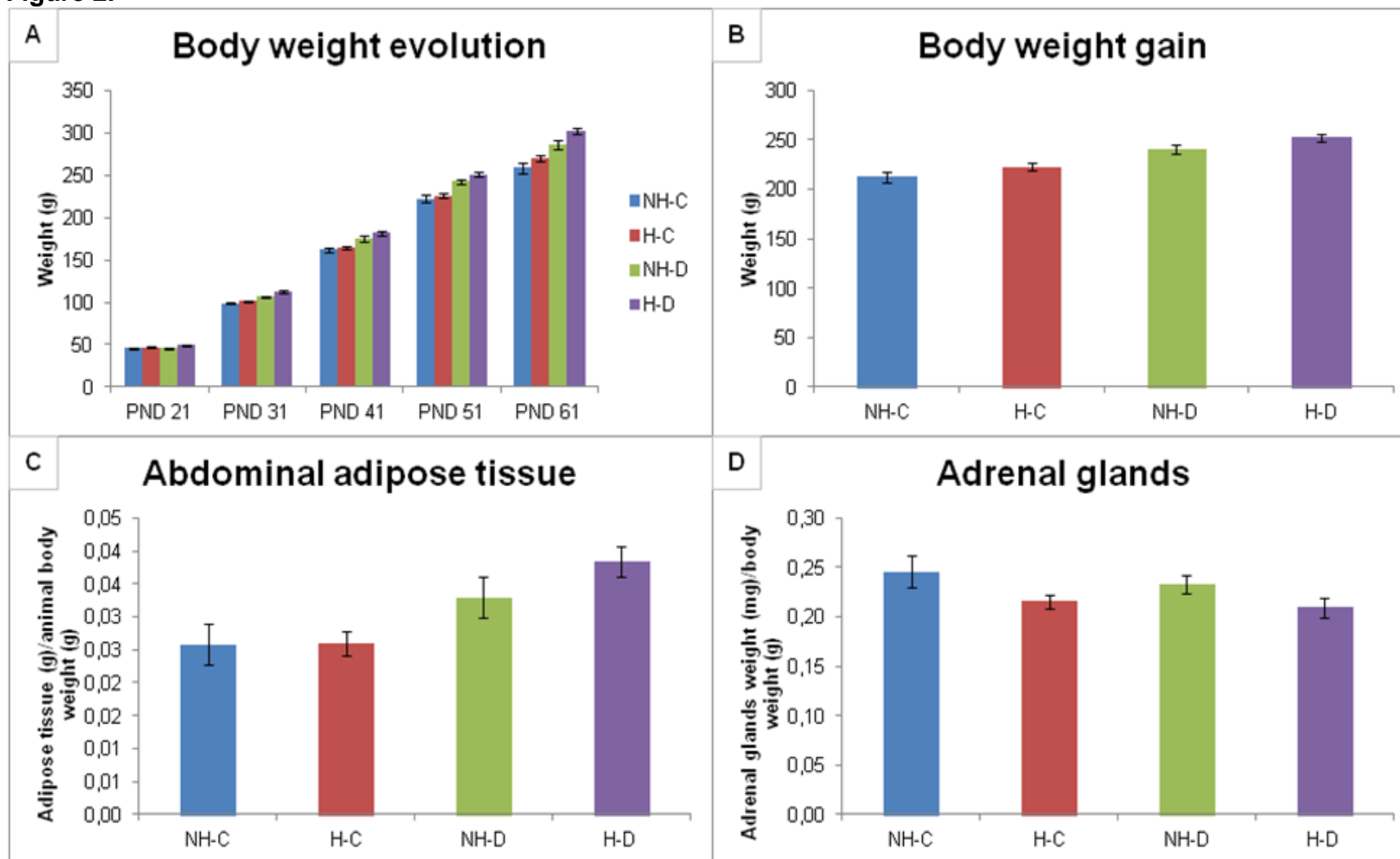


Figure 3.

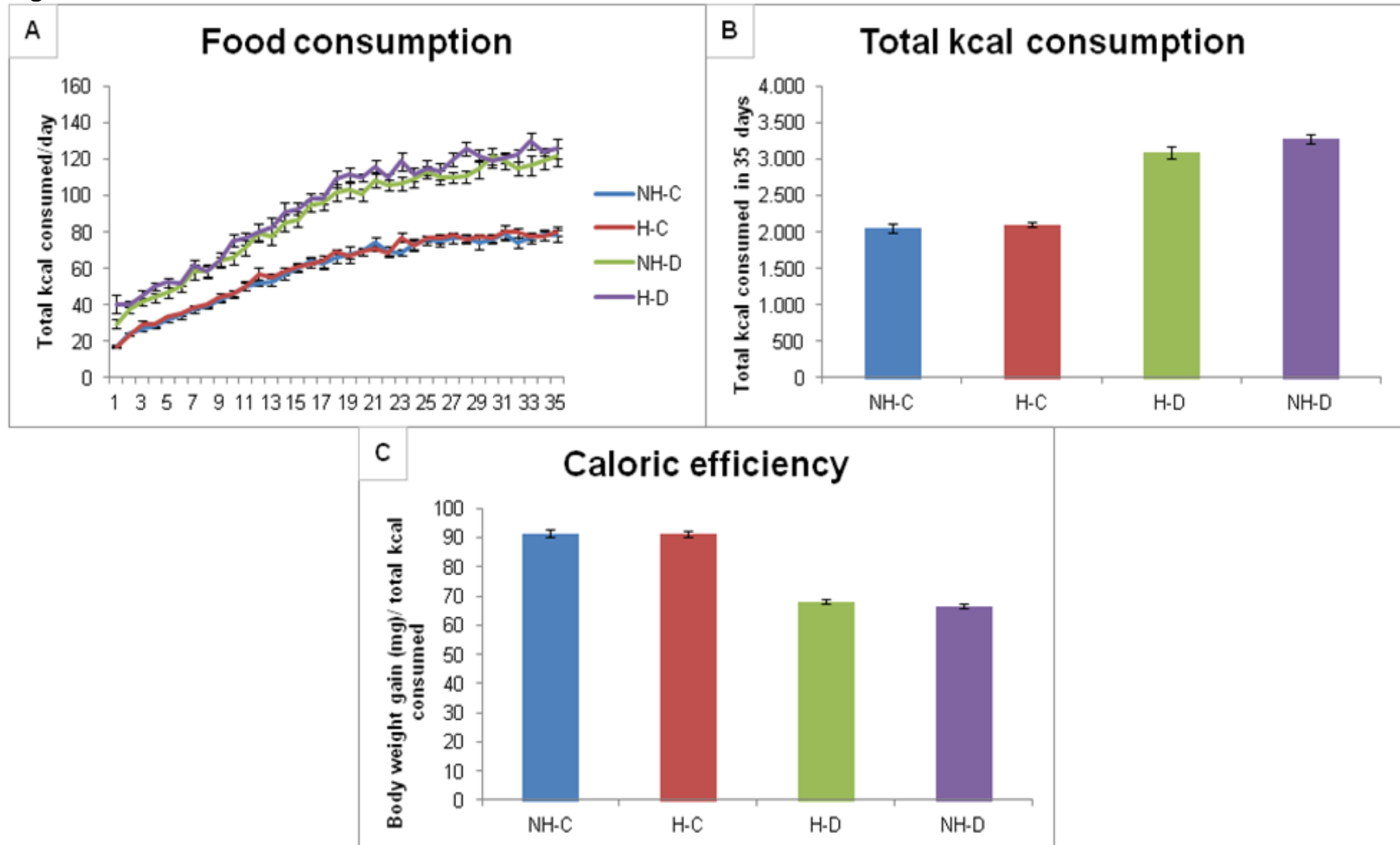


Figure 4.

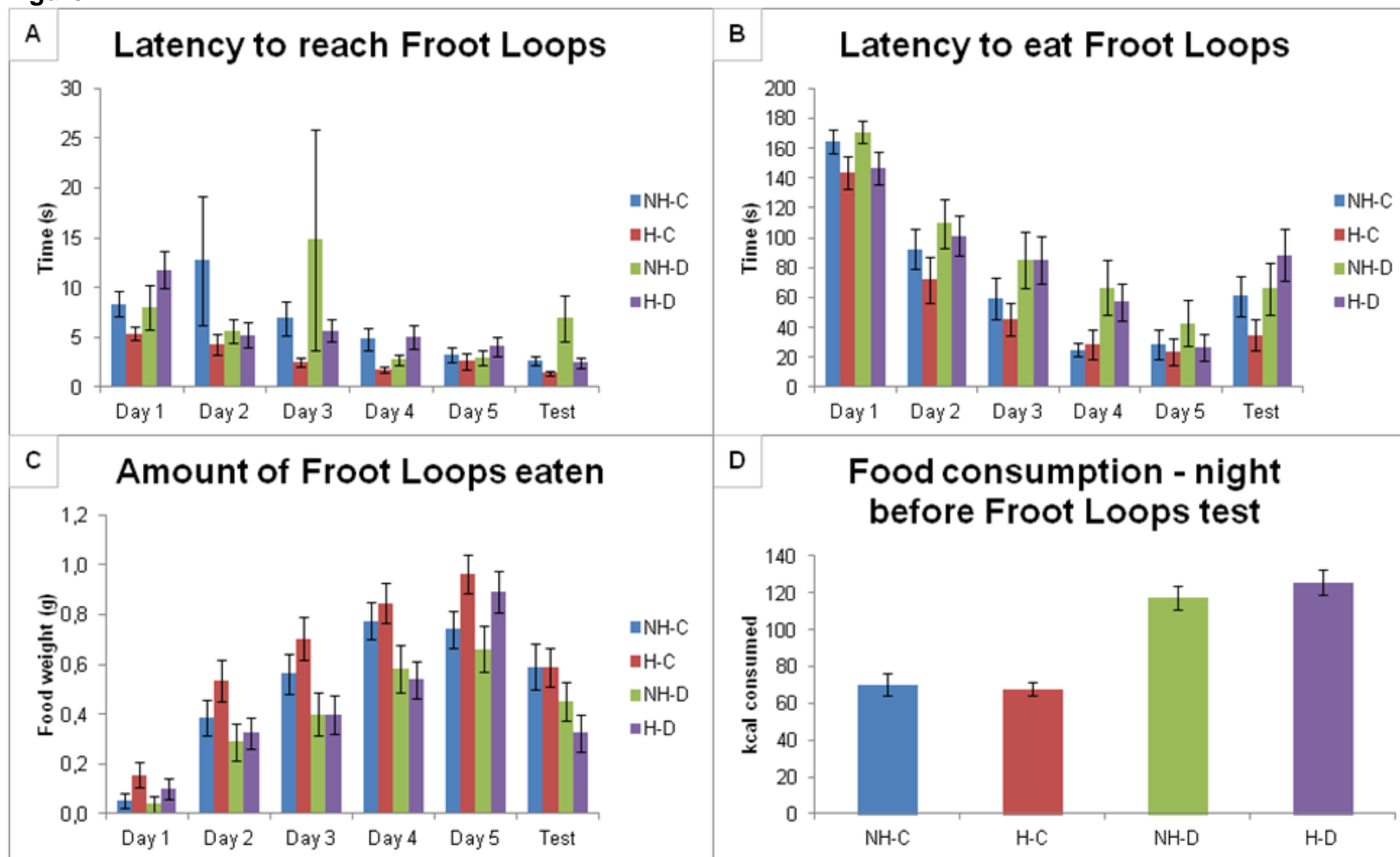




Figure 5.

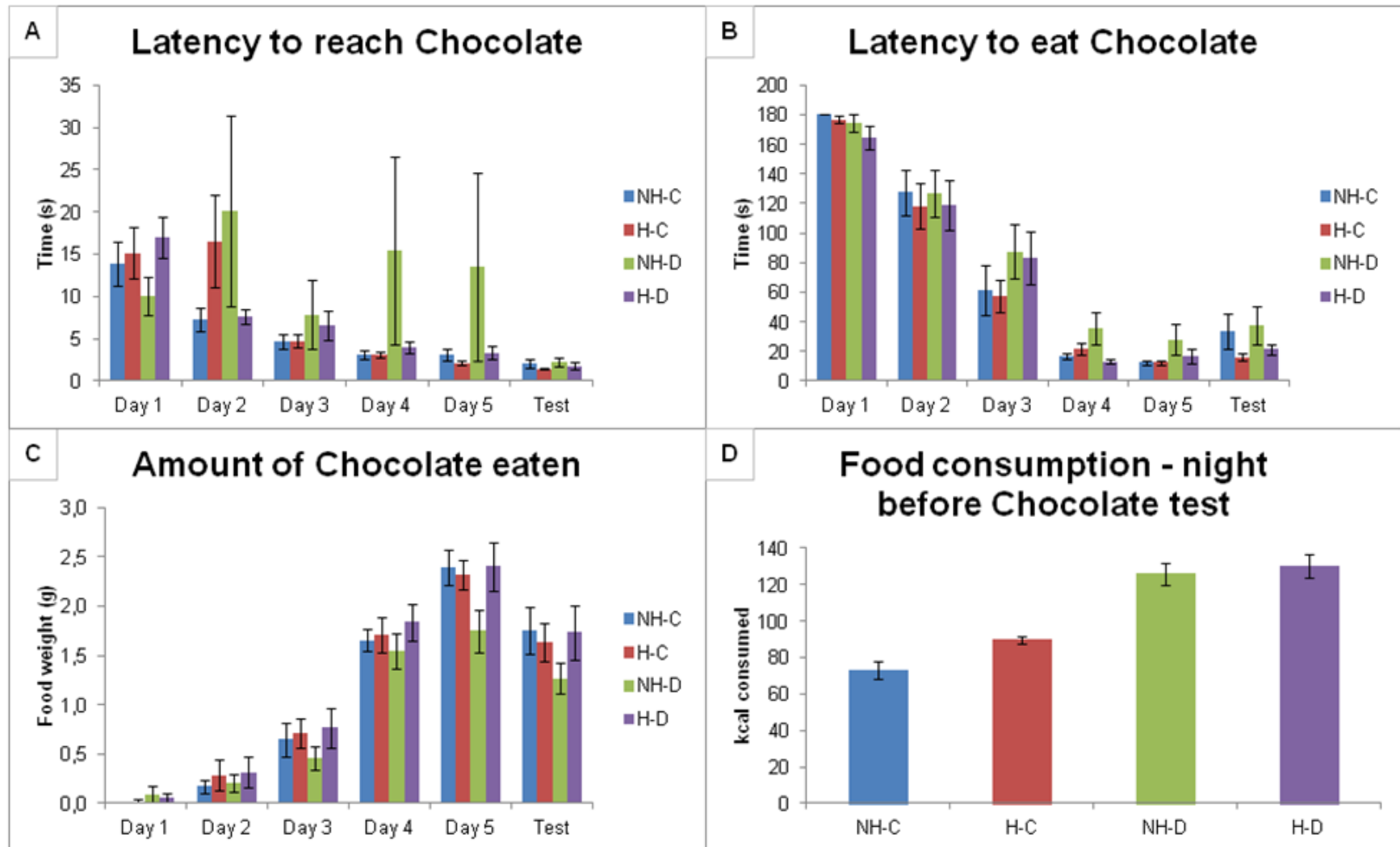


Figure 6.

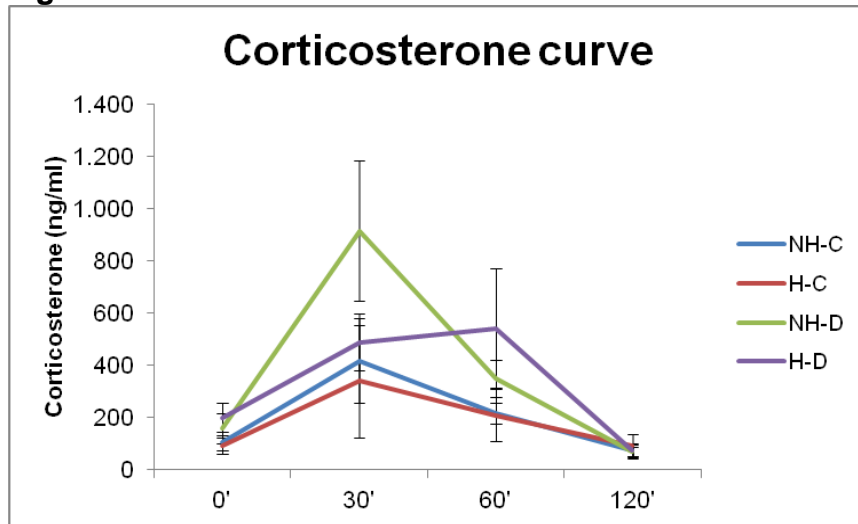
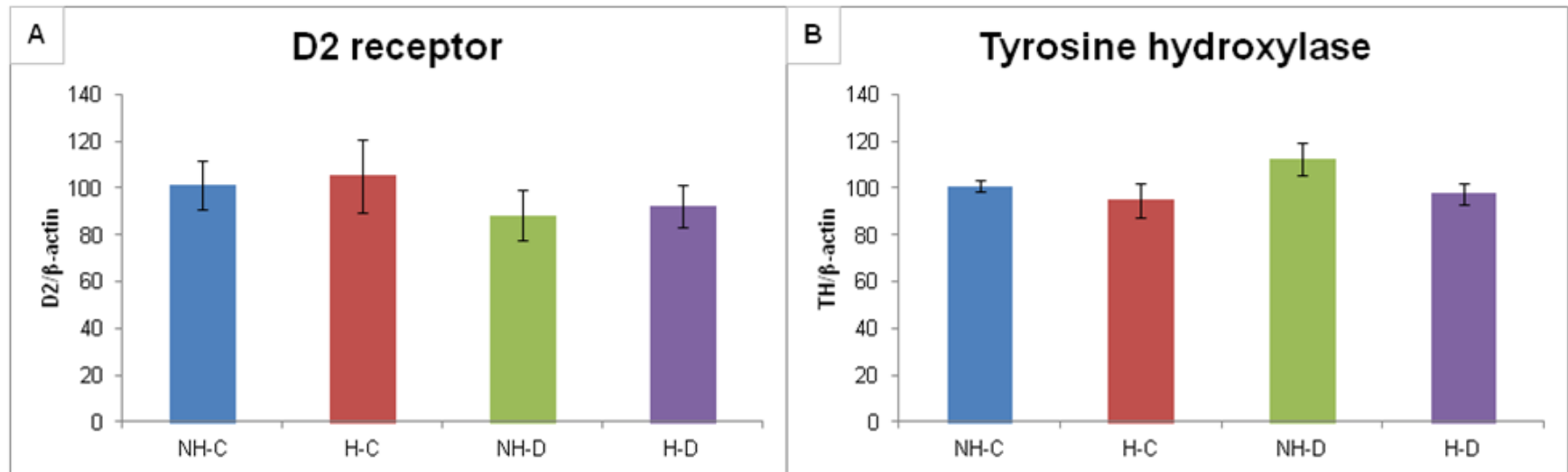


Figure 7.



### **III. Discussão e conclusão**

Com os resultados deste trabalho, pudemos observar que o acesso crônico à dieta palatável enriquecida com carboidratos simples durante um período crítico do desenvolvimento dos animais (a adolescência) foi capaz de produzir diversas alterações tanto no sistema de resposta ao estresse quanto na preferência por novos alimentos palatáveis. Aparentemente, o circuito de recompensa desses animais não está alterado, ao menos a nível de receptores de dopamina tipo D2 no núcleo accumbens (NAc). Uma desregulação desse sistema também poderia ser causada por alterações em receptores D1, e não somente no NAc, além de alterações em outros sistemas de neurotransmissores, como o opióide. Além disso, as alterações no sistema de recompensa causadas pelo excesso de consumo de alimentos palatáveis são encontradas em casos de obesidade já estabelecidas. Não podemos, porém, afirmar que os animais do grupo dieta palatável são obesos. Somado ao fato que esses animais são adultos jovens, esse sobrepeso encontrado pode não ter sido suficiente para induzir uma alteração mais profunda no sistema de recompensa desses animais, o que talvez ocorra com um tempo maior de exposição à dieta palatável, como encontrado em alguns estudos (12 semanas, 15 semanas, ao invés de 6 como foi o caso deste trabalho).

O fato da dieta palatável ter causado um aumento na secreção de corticosterona induzida por estressor agudo foi um pouco surpreendente. A ideia de que dietas palatáveis são consumidas como forma de amenizar os efeitos do estresse já está bastante estabelecida, e foi a nossa base para investigar se o consumo prévio alteraria os efeitos de um estressor posterior. Mas, como demonstrado em alguns estudos, dietas palatáveis consumidas cronicamente parecem agir como indutoras, e não atenuadoras de estressores. Isso apresenta uma importância clínica muito grande, já que as alterações metabólicas causadas pelo consumo crônico excessivo de alimentos palatáveis são graves, e tanto estresse quanto alimentos palatáveis são comuns na vida diária de grande parte da população.

Também foi surpreendente observar que os animais alimentados cronicamente com dieta palatável tiveram um menor consumo de novos alimentos palatáveis; esperávamos que ocorresse o contrário, ou que ao menos não houvesse diferença

entre os grupos. Pensando na obesidade, é positivo observar que a preferência por novos alimentos palatáveis não aumenta com o consumo prévio de outro. Mas como os animais foram deixados em jejum durante a habituação como parte do protocolo desse teste, isso pode ter afetado a preferência dos animais. Talvez esse não seja o melhor teste para observar preferência por alimentos, somente motivação para comer. A palatabilidade dos alimentos é algo a ser melhor estudado, e de que forma a alimentação diária “normal” do indivíduo altera a percepção e preferência por outros alimentos, sejam eles palatáveis ou não.

Quase não observamos efeitos da manipulação neonatal sobre os parâmetros analisados, nem bioquímicos nem comportamentais. Sobre isso, duas colocações: boa parte dos estudos de manipulação neonatal segue protocolos diferentes em relação a tempo e idade dos filhotes, e isso traz diferentes resultados como, por exemplo, na concentração de corticosterona. Em relação os efeitos da manipulação neonatal sobre o consumo de alimentos, somos um dos poucos grupos no mundo que trabalha com isso, então ainda há muito a ser investigado para tirarmos conclusões mais precisas a respeito dessa interação.

Como conclusão, o acesso crônico a uma dieta altamente palatável durante o desenvolvimento dos animais (desde o desmame até a idade adulta), levou a uma maior resposta frente um estressor agudo, maior peso corporal, gordura abdominal e leptina plasmática, além de uma menor preferência a um novo alimento palatável. O consumo crônico de alimentos enriquecidos com carboidratos simples não pareceu ser capaz de mudar o sistema de recompensa desses animais, e a manipulação neonatal não teve efeitos significativos sobre os parâmetros analisados. São necessários mais estudos para compreender como intervenções precoces e o tipo de dieta consumida durante o desenvolvimento afetam o cérebro e o comportamento, o que pode ajudar a elucidar os mecanismos fisiopatológicos que dão origem e estão presentes na obesidade e em outros distúrbios alimentares.

## Bibliografia

- Abizaid, A., & Horvath, T. L. (2005). Unraveling neuronal circuitry regulating energy homeostasis: Plasticity in feeding circuits. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2(3), 191–196. doi:10.1016/j.ddmod.2005.08.009
- Abizaid, A., & Horvath, T. L. (2008). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regulatory Peptides*, 149(1-3), 3–10. doi:10.1016/j.regpep.2007.10.006
- Adam, T. C., & Epel, E. S. (2007). Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavior*, 91, 449 – 458. doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.011
- Avena, N. M., Rada, P. V., & Hoebel, B. G. (2008). Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(1), 20–39. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.04.019
- Banks, W. A., Coon, A. B., Robinson, S. M., Moinuddin, A., Shultz, J. M., Nakaoke, R., & Morley, J. E. (2004). Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*, 53(5), 1253–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111494>
- Banks, W. A. (2006). Blood-brain barrier and energy balance. *Obesity*, 14 Suppl 5(August), 234S–237S. doi:10.1038/oby.2006.315
- Barron, A. B., Søvik, E., & Cornish, J. L. (2010). The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4(October), 163. doi:10.3389/fnbeh.2010.00163
- Benetti, C. da S., Silveira, P. P., Portella, A. K., Diehl, L. A., Nunes, E., de Oliveira, V. S., ... Goldani, M. Z. (2007). Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatric Research*, 62(4), 405–11. doi:10.1203/PDR.0b013e31813cbe8b
- Berridge, K. C. (2009). “Liking” and “wanting” food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology & Behavior*, 97(5), 537–50. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.044
- Berthoud, H.-R. (2007). Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. *Physiology & Behavior*, 91(5), 486–98. doi:10.1016/j.physbeh.2006.12.016
- Berthoud, H.-R., & Morrison, C. (2008). The brain, appetite, and obesity. *Annual Review of Psychology*, 59, 55–92. doi:10.1146/annurev.psych.59.103006.093551

- Berthoud, H.-R., Lenard, N. R., & Shin, A. C. (2011). Food reward, hyperphagia, and obesity. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(6), R1266–77. doi:10.1152/ajpregu.00028.2011
- Blundell, J. E. (1991). Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(4), 147–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2063481>
- Chrousos, G. P. (2010). Stress and sex versus immunity and inflammation. *Science Signaling*, 3(143), pe36. doi:10.1126/scisignal.3143pe36
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Laugero, K. D., Gomez, F., Manalo, S. L., Bell, M. E., & Bhatnagar, S. (2003). A spoonful of sugar: feedback signals of energy stores and corticosterone regulate responses to chronic stress. *Physiology & Behavior*, 79(1), 3–12. doi:10.1016/S0031-9384(03)00100-8
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Strack, A. M., Scribner, K. S., Pecoraro, N. C., la Fleur, S. E., ... Gomez, F. (2004). Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018, 141–50. doi:10.1196/annals.1296.017
- Das, U. N. (2010). Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition*, 26(5), 459–73. doi:10.1016/j.nut.2009.09.020
- De Araujo, I. E., Oliveira-Maia, A. J., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., Nicolelis, M. A. L., & Simon, S. A. (2008). Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron*, 57(6), 930–41. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.032
- Ely, D. R., Dapper, V., Marasca, J., Corrêa, J. B., Gamaro, G. D., Xavier, M. H., ... Dalmaz, C. (1997). Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology & Behavior*, 61(3), 395–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089758>
- Figlewicz, D. P. (2003). Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(4), R882–92. doi:10.1152/ajpregu.00602.2002
- Figlewicz, D. P., Bennett-Jay, J. L., Kittleson, S., Sipols, A. J., & Zavosh, A. (2011). Sucrose self-administration and CNS activation in the rat. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(4), R876–84. doi:10.1152/ajpregu.00655.2010
- Francis, D. D., & Meaney, M. J. (1999). Maternal care and the development of stress responses. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(1), 128–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072372>

- Gearhardt, A. N., Bragg, M. A., Pearl, R. L., Schvey, N. A., Roberto, C. A., & Brownell, K. D. (2012). Obesity and public policy. *Annual Review of Clinical Psychology, 8*, 405–30. doi:10.1146/annurev-clinpsy-032511-143129
- Hajnal, A., Smith, G. P., & Norgren, R. (2004). Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 286*(1), R31–7. doi:10.1152/ajpregu.00282.2003
- Leininger, G. M. (2009). Location, location, location: the CNS sites of leptin action dictate its regulation of homeostatic and hedonic pathways. *International Journal of Obesity, 33 Suppl 2*(S2), S14–7. doi:10.1038/ijo.2009.66
- Leininger, G. M., Opland, D. M., Jo, Y.-H., Faouzi, M., Christensen, L., Cappellucci, L. a, ... Myers, M. G. (2011). Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metabolism, 14*(3), 313–23. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.016
- Levine, S., Haltmeyer, G. C., Karas, G. G., & Denenberg, V. H. (1967). Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behavior, 2*(1), 55–59. doi:10.1016/0031-9384(67)90011-X
- Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences, 746*, 275–88; discussion 289–93. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb39245.x
- Lindberg, M. A., Dementieva, Y., & Cavender, J. (2011). Why has the BMI gone up so drastically in the last 35 years? *Journal of Addiction Medicine, 5*(4), 272–278. doi:10.1097/ADM.0b013e3182118d41
- Majzoub, J. A. (2006). Corticotropin-releasing hormone physiology. *European Journal of Endocrinology, 155*(suppl\_1), S71–S76. doi:10.1530/eje.1.02247
- Meaney, M. J., & Aitken, D. H. (1985). The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Developmental Brain Research, 354*(2), 301–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4052820>
- Mercer, R. E., Chee, M. J. S., & Colmers, W. F. (2011). The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. *Frontiers in Neuroendocrinology, 32*(4), 398–415. doi:10.1016/j.yfrne.2011.06.001
- Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism, 51*(6), 5–10. doi:10.1053/meta.2002.33184



- Morrison, C. D. (2008). Leptin resistance and the response to positive energy balance. *Physiology & Behavior*, *94*(5), 660–3. doi:10.1016/j.physbeh.2008.04.009
- PAHO/WHO. (2007). *Health Situation Analysis in Brazil* (p. 24). Retrieved from [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3228&Itemid=2408](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=3228&Itemid=2408)
- Sapolsky, R. M., & Meaney, M. J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hypo-responsive period. *Brain Research*, *396*(1), 64–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3011218>
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, *21*(1), 55–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696570>
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Clemente, Z., Bassani, E., Tabajara, Â. S., Gamaro, G. D., ... Dalmaz, C. (2004). Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiology & Behavior*, *80*(5), 739–45. doi:10.1016/j.physbeh.2003.12.009
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Clemente, Z., Gamaro, G. D., & Dalmaz, C. (2005). The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *23*(1), 93–9. doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.07.018
- Silveira, P. P., Benetti, C. da S., Ayres, C., Pederiva, F. Q., Portella, A. K., Lucion, A. B., & Dalmaz, C. (2006). Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behavioural Brain Research*, *173*(2), 205–10. doi:10.1016/j.bbr.2006.06.031
- Silveira, P. P., Portella, A. K., Crema, L. M., Correa, M. D., Nieto, F. B., Diehl, L. A., ... Dalmaz, C. (2008). Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. *Physiology & Behavior*, *93*, 877–882. doi:10.1016/j.physbeh.2007.12.003
- Stice, E., Figlewicz, D. P., Gosnell, B. A., Levine, A. S., & Pratt, W. E. (2013). The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(9 Pt A), 2047–58. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.12.001
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, *53*(4), 865–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377295>
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Tomasi, D., & Baler, R. D. (2013a). Obesity and addiction: neurobiological overlaps. *Obesity Reviews*, *14*(1), 2–18. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01031.x

- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Tomasi, D., & Baler, R. D. (2013b). The addictive dimensionality of obesity. *Biological Psychiatry*, *73*(9), 811–8. doi:10.1016/j.biopsych.2012.12.020
- WHO. (2012). *World Health Statistics* (p. 180). Retrieved from [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6795%3Aworld-health-statistics-2012&catid=2394%3Areports&Itemid=2395&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6795%3Aworld-health-statistics-2012&catid=2394%3Areports&Itemid=2395&lang=en)
- Zhang, Y., & Scarpance, P. J. (2006). The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiology & Behavior*, *88*(3), 249–56. doi:10.1016/j.physbeh.2006.05.038
- Zheng, H., & Berthoud, H.-R. (2008). Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology*, *23*, 75–83. doi:10.1152/physiol.00047.2007